



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CAMPUS DE CURITIBANOS – CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOSISTEMAS AGRÍCOLAS E NATURAIS

André Luiz Graf Junior

Potencialidade de fungos no biocontrole de *Sclerotinia sclerotiorum* na cultura do feijoeiro *in vitro* e em campo

Curitibanos

2021

André Luiz Graf Junior

Potencialidade de fungos no biocontrole de *Sclerotinia sclerotiorum* na cultura do feijoeiro *in vitro* e em campo

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ecossistemas Agrícolas e Naturais (PPGEAN) do Centro de Ciências Rurais da Universidade Federal de Santa Catarina – Campus de Curitibanos, para obtenção do Grau de Mestre em Ciências.

Orientadora: Profa. Dra. Adriana Terumi Itako
Coorientador: Prof. Dr. João Batista Tolentino Júnior
Área de Concentração: Manejo e Conservação de Ecossistemas Agrícolas e Naturais
Linha de Pesquisa: Manejo Integrado de Sistemas Agrícolas e Florestais

Curitibanos

2021

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Graf Junior, André Luiz

Potencialidade de fungos no biocontrole de *Sclerotinia sclerotiorum* na cultura do feijoeiro in vitro e em campo / André Luiz Graf Junior ; orientadora, Adriana Terumi Itako, coorientador, João Batista Tolentino Júnior, 2021.

62 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Curitibanos, Programa de Pós-Graduação em Ecossistemas Agrícolas e Naturais, Curitibanos, 2021.

Inclui referências.

1. Ecossistemas Agrícolas e Naturais. 2. Controle Biológico. 3. *Phaseolus vulgaris*. 4. Patógenos do solo. I. Itako, Adriana Terumi. II. Tolentino Júnior, João Batista. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ecossistemas Agrícolas e Naturais. IV. Título.

André Luiz Graf Junior

**POTENCIALIDADE DE FUNGOS NO BIOCONTROLE DE *Sclerotinia sclerotiorum*
NA CULTURA DO FEIJOEIRO *in vitro* E EM CAMPO**

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof.^a Elis Borcioni, Dr.^a

Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.^a Kátia Regina Freitas Schwan-Estrada, Dr.^a

Universidade Estadual de Maringá

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de Mestre em Ciências

Prof. Alexandre Siminski, Dr.

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Prof.^a Adriana Terumi Itako, Dr.^a

Orientadora

Curitiba, 2021.

Este trabalho é dedicado à minha família.

AGRADECIMENTOS

A Deus por me dar forças para seguir os meus sonhos.

Aos meus pais Judite Graf e André Graf, pelo amor, carinho, incentivo e exemplo dado, para que eu sempre buscasse conhecimentos teóricos da prática vivida e que as raízes fossem a força da busca por uma educação de qualidade.

A minha esposa Carla Graf, pelo amor e carinho e por me acompanhar e entender diariamente a importância da realização dos meus sonhos e objetivos.

A minha irmã Andrea Graf por sempre acreditar em mim e me impulsionar a seguir.

Aos meus irmãos Everton Graf e Paulo Cesar Graf (*in memoriam*) por todos os ensinamentos que deixaram à mim e por toda a admiração deixada que está guardada em meu coração.

Aos meus amigos Pedro Medrado, Allan Piovesam, Carolina Novicki, Simone Fontoura e Maria Bastos, por estarem sempre presentes, me acompanhando nos momentos mais difíceis e felizes da vida, com muito amor, carinho, dedicação, apoio e empatia.

A minha orientadora Adriana Itako, minha mãe científica, por todo os ensinamentos e dedicação a mim, é responsável por me despertar o interesse e amor pela pesquisa e pela fitopatologia, nunca me deixou desistir, que por mais difícil que seja há sempre algo que nos faça sorrir; e ao meu coorientador João B. Tolentino Jr. por todo seu conhecimento que me guiou nas análises e a paciência em todo o processo da metodologia e análises dos dados.

A todos os meus colegas de laboratório, pela troca de ideia e conhecimento trocado durante o processo.

Aos docentes do PPGEAN-UFSC, que mesmo em um momento difícil que estamos passando no mundo devido ao Covid-19, não mediram esforços em auxiliar e passar o conhecimento necessário para a formação.

Por fim, agradeço à FAPESC e UNIEDU pelo auxílio financeiro dado em forma de bolsa para que a pesquisa pudesse ser desenvolvida.

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a eficiência de diferentes substratos em meio líquido e sólido, na formação de conídios de fungos, e analisar o potencial destes fungos como biocontrolador de *Sclerotinia sclerotiorum in vitro* e na cultura do feijoeiro. Os substratos alternativos avaliados foram: V8: melado : KNO₃ : K₂SO₄ (T1), V8 : melado : (NH₄) NO₃ (T2) e V8 : melado : (NH₄) : 2SO₄ (T3), arroz parboilizado (T4), farelo de milho (T5) e farelo de trigo (T6). A avaliação dos biocontroladores (competidor ou antibiose) de *S. sclerotiorum*, foi conduzido *in vitro* e as avaliações foram realizadas diariamente e com os dados de crescimento foi calculada a Área Abaixo da Curva de Crescimento Micelial (AACCM), o Índice de Velocidade do Crescimento Micelial (IVCM) e o Percentual de Inibição de Crescimento dos fungos. Após as análises em laboratório, foram selecionados os biocontroladores que tiveram maior produção de conídios e foram eficientes no controle do patógeno nas condições *in vitro*, para a avaliação em campo no controle do patógeno no feijoeiro. Os resultados apontam que os 18 fungos biocontroladores armazenados em método de Castellani mantiveram-se eficientes, quanto ao crescimento e mantiveram o potencial biocontrolador. Com relação aos substratos em meio sólido, o T4 apresentou os melhores valores para a produção de conídios, além disso, todos os isolados, apresentaram produção nesse substrato. O isolado que apresentou maior produção de conídios foi o SC1152, com 2,3x10⁹ conídios/mL. Já em meio líquido, o substrato T3 mostrou-se melhor, e o isolado que teve maior produção de conídios foi o SC1161, com 1,6x10⁹ conídios/mL. O isolado SC1157 biocontrolador do tipo antibiose, alcançou 31,4% de inibição do crescimento para a AACCM e 27% para IVCM, já os biocontroladores do tipo competidores, o isolado SC1152 inibiu 37,15% e 57,05% para AACCM e IVCM, respectivamente. Quanto aos resultados a campo, todos os isolados apresentaram controle da doença. O menor número de plantas infectados e a menor severidade da doença no feijoeiro aos 103 dias após a semeadura (DAS), foi pelo biocontrolador SC1152, com relação à altura das plantas, não houve diferença estatística, mas para o comprimento das raízes e número de vagens a testemunha apresentou-se inferior aos tratamentos com biocontroladores.

Palavras-chave: Controle biológico, *Phaseolus vulgaris*, patógenos do solo.

ABSTRACT

The objective of this work was to evaluate the efficiency of different substrates in liquid and solid in the formation of fungi conidia, in addition to analyzing the potential of these fungi as a biocontroller of *Sclerotinia sclerotiorum* *in vitro* and in bean culture. Alternative substrates were evaluated: V8: molasses: KNO₃: K₂SO₄ (T1), V8: molasses: (NH₄) NO₃ (T2) and V8: molasses: (NH₄) : 2SO₄ (T3), parboiled rice (T4), corn bran (T5) and wheat bran (T6). The evaluations as biocontrollers (competitor or antibiosis) of *S. sclerotiorum*. This test was carried out under *in vitro* conditions and evaluations were performed daily and with the growth data, the area under the curve mycelial growth (AUCMG) and the mycelial growth index (MGI) and the growth inhibition percentage were calculated fungi. After laboratory analysis, biocontrollers that had the best production of conidia and were efficient in controlling the pathogen, for field evaluation, for controlling the pathogen in beans were selected. The results show that the 18 biocontroller fungi stored in the Castellani method remained efficient, in terms of growth and biocontroller potential. Regarding the solid substrates, T4 presented the best values, for the production of conidia, in addition, all the isolates, presented production in this substrate. The isolate with the highest conidia production was SC1152, with 2.3x10⁹ conidia / mL. In liquid substrates, the substrate T3 was better, and the isolate that had the highest production of conidia was SC1161, with 1.6x10⁹ conidia / mL. The SC1157 isolate of the antibiosis type, reached 31.4% of growth inhibition for AUCMG and 27% for MIG, whereas the competitor type biocontrollers, the SC1152 isolate inhibited 37.15% and 57.05% for AUCMG and MGI, respectively. As for the results in the field, all isolates had control of the disease. The lowest number of infected plants and the lowest disease severity in common bean at 103 days after sowing (DAS) was due to the SC1152 biocontroller, with respect to plant height, there was no statistical difference, but for root length and number of pods, the control less than treatments with biocontrollers.

Keywords: Biological control, *Phaseolus vulgaris*, soil pathogens

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Câmera acoplada ao microscópio de luz para a observação dos conídios.....	14
Figura 2 – Imagem capturadas do isolado SC1152, em câmera de Neubauer para contagem dos conídios obtidos nos nos tratamentos T1 (V8 : melado : KNO3 : K2SO4), T2 (V8 : melado : (NH4) NO3) e T3 (V8 : melado : (NH4) : 2SO4), (T4) arroz parboilizado, (T5) farelo de milho e (T6) farelo de trigo.	16
Figura 3- Esquema de medições do diâmetro das colônias, em três sentidos diametralmente opostos do disco do fungo <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> utilizadas para obtenção dos dados de crescimento.....	17
Figura 4- Esquema de duas retas perpendiculares intersectadas no centro do disco do fungo <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> utilizadas para obtenção dos dados de crescimento.....	18
Figura 5 - Arroz parboilizado colonizado por fungo biocontroladores	20
Figura 6- Esquema da experimentação em campo com quatro fungos biocontroladores de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> na cultura do feijoeiro, na cidade de Monte Castelo/SC.	21
Figura 7 - Crescimento do isolado fúngico em todos os tratamentos com meios líquidos e sólido.	23
Figura 8 - Técnica de cultura pareada em avaliação do crescimento micelial de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> pareado com os fungos SCC1157, SC1206, SC1170 e SC1178 classificados como biocontroladores do tipo antibiose.....	29
Figura 9 - Percentual de inibição da Área Abaixo da Curva do Crescimento Micelial (AACCM) de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> , pareado com os fungos SCC1157, SC1206, SC1170 e SC1178, classificados como biocontroladores do tipo antibiose.	30
Figura 10 - Percentual de inibição da velocidade do crescimento micelial (%) de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> pareado com os fungos SCC1157, SC1206, SC1170 e SC1178 classificados como biocontroladores do tipo antibiose.....	31
Figura 11- Cultura pareada na avaliação do crescimento micelial de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> com os fungos SC1279, SC1259, SC1161, SC1152, SC1244, SC1168, SC1251, SC 1278 e sc1291 classificados como biocontroladores do tipo competidores.....	32
Figura 12 - Percentual de inibição da Área Abaixo da Curva de Crescimento Micelial (AACCM) de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> pareado com nove fungos classificados como biocontroladores do tipo competição.....	33

Figura 13 - Percentual de inibição do Índice de Velocidade do Crescimento Micelial (IVCM) de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> pareado com nove fungos classificados como biocontroladores do tipo competição.	34
Figura 14 - Primeiros sinais em plantas de feijão infectadas com <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> , observados aos 63 dias após a semeadura, ramos e folhas recobertas com mofo.	35
Figura 15 - Volume (mm) da precipitação durante a execução do experimento (período de 01/11/2020 a 23/01/2021), na fase reprodutiva da cultura.	36
Figura 16 - Temperatura do ar máxima e mínima durante a execução do experimento período de 01/11/2020 a 23/01/2021) na fase reprodutiva da cultura.	36
Figura 17- Plantas de feijão infectadas com <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> , aos 75 dias após a semeadura, ramos e vagens recobertas com mofo e formação de escleródios.	37
Figura 18- Número de plantas de feijão infectadas com <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> , em diferentes períodos de avaliação em dias após a semeadura (DAS), tratadas com diferentes fungos biocontroladores da doença.	38
Figura 19 – Escala de notas para a severidade do mofo branco (<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>) na cultura do feijoeiro, tratados com diferentes fungos biocontroladores, a partir do aparecimento dos sinais do patógeno.	39
Figura 20 - Perfil das vagens e grãos do feijão aos 97 dias após a semeadura.	39
Figura 21 - Vagens com grãos brotados no momento da colheita do feijão aos 103 dias após a semeadura.	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Isolados fúngicos testados em diferentes substratos para produção de conídios	24
Tabela 2 – Número total de conídios/ml (10^6) obtidos em substratos de meio líquido e sólido após sete dias de incubação (Temperatura: $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas), de diferentes fungos com potencial biocontrolador.	26
Tabela 3 - Efeito da aplicação de fungos biocontroladores na altura das plantas (m), comprimento das raízes (cm) e no número de vagens do feijoeiro (<i>Phaseolus vulgaris</i>) em condições de campo aos 103 dias após a semeadura.....	40

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	2
1.1 OBJETIVOS.....	3
1.1.1 Objetivo geral.....	3
1.1.2 Objetivos específicos.....	3
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	4
2.1 CULTURA DO FEIJOEIRO <i>Phaseolus vulgaris</i> L.....	4
2.2 FUNGOS DO SOLO.....	5
2.2.1 <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>.....	6
2.3 CONTROLE DO FUNGO <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	8
2.4 CONTROLE BIOLÓGICO.....	9
2.5 SUBSTRATOS PARA PRODUÇÃO DE FUNGOS ANTAGONISTAS.....	11
3 METODOLOGIA.....	13
3.1 CARACTERIZAÇÃO DA ÁREA E PROCEDÊNCIA DOS FUNGOS BIOCONTROLADORES.....	13
3.2 REATIVAÇÃO DOS MICRORGANISMOS.....	13
3.3 PRODUÇÃO DE CONÍDIOS DOS FUNGOS EM MEIO LÍQUIDO.....	13
3.4 PRODUÇÃO DE CONÍDIOS DOS FUNGOS EM MEIO SÓLIDO.....	14
3.5 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOCONTROLADOR <i>in vitro</i>	16
3.6 AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DOS FUNGOS BIOCOTROLADORES NA CULTURA DO FEIJOEIRO EM CONDIÇÕES DE CAMPO.....	19
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	22
4.1 REATIVAÇÃO DOS MICRORGANISMOS.....	22
4.2 PRODUÇÃO DE CONÍDIOS DOS FUNGOS EM MEIO LÍQUIDO E SÓLIDO.....	23
4.3 PERCENTUAL DE INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO MICELIAL DE <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	29

4.4 EFICÁCIA DOS FUNGOS BIOCOTROLADORES NA CULTURA DO FEIJOEIRO EM CONDIÇÕES DE CAMPO	35
5 CONCLUSÃO.....	42
REFERÊNCIAS	43

1 INTRODUÇÃO

Os fungos com potencial de antagonismo são capazes de se estabelecer, colonizar e se dispersar nos ecossistemas, o que garante sua eficiência em diferentes áreas. Por isso, pode-se buscar por microrganismos que sejam capazes de controlar doenças e assim, reduzir o uso de fungicidas, sem comprometer a produtividade agrícola (ÁVILA *et al.*, 2005).

A ocorrência de doenças de plantas, ocasionado por patógenos do solo, está ligada principalmente ao desequilíbrio do ecossistema em questão (ZAMBOLIM *et al.*, 2014). Isso faz com que ocorram inúmeras doenças, como por exemplo, o mofo branco, ocasionado pelo fungo *Sclerotinia sclerotiorum*. Esta espécie produz estruturas de resistência chamadas escleródios, que podem permanecer viáveis no solo por longos períodos, mesmo na ausência do hospedeiro susceptível (WHEELER; RUSH, 2001). Por apresentar difícil controle, o uso de produtos químicos é uma prática muito utilizada para tentar minimizar os prejuízos ocasionados por esse patógeno (MUELLER *et al.*, 2002; SILVA *et al.*, 2018). No entanto, esse manejo realizado em diversas áreas da agricultura, torna-se cada vez mais preocupante devido aos seus impactos no ambiente e na saúde humana.

Em busca de alternativas que visam diminuir o uso de produtos químicos, o controle biológico vem ganhando destaque no uso agrícola, do ano de 2018 para 2019, o Brasil teve um aumento de 77% de crescimento na indústria de produtos biológicos (MEYER *et al.*, 2019), sendo que existem cerca de 31 produtos à base de fungos biocontroladores no mercado brasileiro (AGROFIT, 2021). Contudo, ainda há dificuldades em suas aplicações, devido à grande quantidade de fungicidas que ainda são utilizados e que acabam dificultando a colonização desses fungos, além da necessidade de produtos compatíveis, para serem aplicados no manejo integrado de doenças (AMORIM *et al.*, 2018; MEYER *et al.*, 2019). Adicionalmente, existem dificuldades no desenvolvimento efetivo de novos produtos biológicos para a entrada no mercado (DROBY *et al.*, 2016).

Os fungos utilizados no biocontrole causam diferentes efeitos sobre as plantas, pois colonizam o sistema radicular, resultando no aumento e desenvolvimento dos sistemas radiculares e aéreos e podem levar ao aumento na produção das culturas. Assim, há necessidade de melhorar o manejo da área e as formas de aplicação dos produtos, obtendo os resultados esperados quando há a aplicação do controle biológico nas culturas (HYDER *et al.*, 2017; AMORIM *et al.*, 2018). A utilização de controle biológico torna-se promissora, porque pode ser aplicada em diversas culturas por pequenos e grandes produtores.

O controle biológico de doenças em plantas está atrelado às interações que ocorrem entre a planta hospedeira, os patógenos presentes na área e os microrganismos não patogênicos, sendo estes, os responsáveis por limitar a atividade do patógeno ou aumentar a resistência do hospedeiro (RAMÍREZ-VALDESPINO *et al.*, 2019). A utilização de fungos biocontroladores contra patógenos de plantas tem-se mostrado bastante eficaz, podendo reduzir o uso de pesticidas, possibilitando a conservação dos recursos naturais, menor impacto ambiental e evitando o rompimento do equilíbrio ecológico (SILVA; MELLO, 2007), nesse sentido contempla os propósitos do Programa de Pós-Graduação em Ecossistemas Agrícolas e Naturais da Universidade Federal de Santa Catarina.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

O objetivo do trabalho é avaliar o efeito de diferentes substratos em meio líquido e sólido no crescimento e esporulação de diferentes fungos, e analisar o potencial desses como biocontroladores do fungo *Sclerotinia sclerotiorum in vitro* e na cultura do feijão em condições de campo.

1.1.2 Objetivos específicos

- Avaliar o crescimento e a viabilidade dos fungos com potencial biocontrolador armazenados pelo método de Castellani;
- Caracterizar substratos em meio líquido e sólido que potencializam a esporulação dos fungos biocontroladores;
- Avaliar o potencial do tipo antibiose dos fungos isolados no biocontrole de *S. sclerotiorum*;
- Avaliar o potencial do tipo competidor dos fungos isolados no biocontrole de *S. sclerotiorum*.
- Avaliar a eficácia dos fungos no biocontrole de *S. sclerotiorum* na cultura do feijoeiro em campo.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 CULTURA DO FEIJOEIRO *Phaseolus vulgaris* L.

O feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é pertencente à família Fabaceae, que compreende as leguminosas (SANTOS; GAVILANES, 2006), foi domesticado nas regiões montanhosas da América Latina há mais de 7.000 anos (GRAHAM; RANALLI, 1997), e cultivado em todos os continentes, adaptável desde o nível do mar até 3.000 m. No entanto, essa cultura é pouco tolerante a fatores de extremos ambientais e é exigente em várias questões edafoclimáticas, sendo a média de temperatura para seu desenvolvimento de 15 a 29 °C, sensível à ocorrência de geadas e à altas temperaturas no seu período reprodutivo (SILVA; WANDER, 2013).

Além disso, a precipitação é extremamente importante para seu bom desenvolvimento pois é sensível a períodos de distribuição pluviométricas irregulares, sendo que necessita de 300 a 400 mm. por safra, desde que sejam chuvas regulares e bem distribuídas, sabendo que se trata de uma cultura muito sensível a estresses, principalmente na fase de floração e enchimento dos grãos, além disso, colheita com muita chuva acarreta prejuízos como a brotação ou manchas nos grãos (SILVA; WANDER, 2013).

Em termos de produção mundial, a média é de 23,3 milhões de toneladas de feijão seco. O Brasil foi considerado em 2015, o terceiro maior produtor mundial, respondendo por 11% da produção, atrás de Índia (14%) e Myanmar (13%) e à frente dos Estados Unidos (4%), da China, do México (4%) e da Tanzânia (3%). Em termos de regiões, o Nordeste foi a que apresentou maior área plantada em termos absolutos e a Região Sul, a maior área relativa plantada com feijão durante o período 1990 a 2016. Com exceção do centro-oeste, todas as regiões brasileiras apresentaram progressiva redução da área plantada com feijão nas últimas décadas (LANDAU *et al.*, 2020). Na safra de 2019/20 a produção de feijão foi de aproximadamente 250 mil toneladas, sendo que a região Sul foi responsável por 72 mil toneladas do grão (CONAB, 2020).

Na década de 90, municípios catarinenses como Curitibanos e Campo Novos, foram considerados os maiores produtores de feijão preto no estado, chegando a 16 mil toneladas do grão, com a microrregião produzindo mais de 36 mil toneladas por safra, corroborando com 1,35% da produção brasileira, mas com o passar do tempo acabaram diminuindo suas áreas plantadas, sendo substituídas por outras culturas (LANDAU *et al.*, 2020).

O feijão uirapuru, é uma cultivar indicada para a colheita mecanizada, pois tem porte tipo ereto, com média de 68 cm de altura. A cor do grão é preto e apresenta um hábito de crescimento indeterminado. O ciclo médio da cultivar é de 86 dias e o florescimento geralmente ocorre aos 44 dias após a semeadura (DAS). Além disso, essa cultivar apresenta resistência a algumas doenças, como a ferrugem e o mosaico comum, no entanto é susceptível a ocorrência da antracnose, além disso, não apresenta resistência contra mofo branco (AGRANDA, 2020).

O feijoeiro é afetado por dezenas de doenças causadas por fungos, bactérias, vírus e nematóides. Cada doença tem sua importância epidemiológica e apresenta diferentes exigências para sua ocorrência, portanto, é importante o diagnóstico correto para se aplicar um bom manejo. Dentre os principais fungos fitopatogênicos de ocorrência no Brasil, pode-se citar *S. sclerotiorum*, *Sclerotium rolfsii*, *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum*, *Macrophomina phaseolina*, *Colletotrichum lindemuthianum*, *Pseudocercospora griseola*, *Uromyces appendiculatus*, *Alternaria alternata* e *Colletotrichum dematium* (WENDLAND *et al.*, 2018). Na grande maioria, a indicação de controle é baseada em produtos químicos, tendo um ou mais princípios ativos para o controle dos patógenos (AGROFIT, 2021).

Dentre as doenças de relevância para a cultura, destaca-se o mofo branco causado por *S. sclerotiorum*, onde os sintomas iniciam-se nas hastes, aproximadamente de 10 a 15 cm acima do solo, com a formação de micélio branco. O início da infecção geralmente coincide com o fechamento das entrelinhas da cultura e o florescimento, quando pétalas de flores senescentes são colonizadas pelo patógeno que, a seguir, invade outros órgãos da planta. A partir disso, as folhas, hastes e vagens mais severamente atacadas podem apodrecer e cair, trazendo enormes prejuízos à produção das plantas, menor tamanho dos grãos e sementes (PAULA JÚNIOR *et al.*, 2009; WENDLAND *et al.*, 2018).

2.2 FUNGOS DO SOLO

O solo é habitat de muitos fungos, que constituem uma parte importante da biomassa microbiana e participam de forma efetiva em diversos processos (MONTEIRO, 2012). Os fungos saprofitos desempenham importância na formação do solo, evolução da fertilidade, nutrição de plantas, além da formação e melhoria da estrutura do solo, fazendo parte do processo de degradação de substâncias tóxicas (BUÉE *et al.*, 2007).

Outra função importante é a ciclagem de nutrientes, a qual está ligada com a estabilidade e melhoria do funcionamento dos ecossistemas terrestres. Além da importância ambiental já citada, os fungos apresentam um grande potencial biotecnológico, como a formulação de bioinoculantes para produção agroflorestal, produção de fármacos e atuantes como controle biológico (GOI; SOUZA, 2006; PAN *et al.*, 2008).

Em relação às interações ecológicas dentro de um contexto simbiótico, a sobrevivência e manutenção de muitos microrganismos e da planta ocorre pela reciprocidade de oferta de nutrientes para ambos os organismos. A atividade microbiana tem como principal fonte de nutrientes os compostos orgânicos excretados, principalmente, pelas raízes na forma de exsudatos, os quais estão em maior abundância na rizosfera. A qualidade desses exsudatos vai compor qualitativamente e quantitativamente a biomassa microbiana existente (REIS *et al.*, 2010). Tratando nesse sentido ecológico e nutricional, a interação dos microrganismos com o solo e a planta é um pressuposto ecossistêmico fundamental, pois não há como dissociar a relação nutricional das plantas no solo da relação com os microrganismos (HIRATA; ANDRADE FILHO, 2011).

Quanto à ocorrência de doenças de plantas, ocasionada por patógenos veiculados pelo solo, pode-se dizer que o desequilíbrio biológico é o principal fator para que isso ocorra. Quando há um equilíbrio no ecossistema, ocorre uma alta taxa de mortalidade de patógenos e uma baixa incidência de doenças, devido aos mecanismos naturais, como parasitismo, competição, antibiose e predação (ZAMBOLIM *et al.*, 2014).

Segundo Wheeler; Rush (2001), podem ser destacados alguns gêneros fúngicos causadores de doenças em plantas, como o *Cylindrocladium*, *Fusarium*, *Macrophomina*, *Rhizoctonia*, *Sclerotinia* e *Sclerotium*. Esses patógenos muitas vezes são agressivos por apresentarem elevada capacidade de competição saprofítica e podem sobreviver em resíduos de plantas introduzidos no solo e na forma de estruturas de resistência, no caso do *Sclerotium* e *Sclerotinia*, permanecendo viáveis na ausência de plantas por longos períodos. Logo, uma vez que esses fungos fitopatogênicos são introduzidos no solo, torna-se difícil sua erradicação, por apresentarem tantas características de adaptabilidade.

2.2.1 *Sclerotinia sclerotiorum*

O fungo *S. sclerotiorum*, identificado em 1884, está distribuído mundialmente, e vem sendo estudado desde então. Para tanto o seu controle é basicamente realizado com o uso de

fungicida (MUELLER *et al.*, 2002; SILVA *et al.*, 2018), no entanto o uso do controle biológico acaba sendo prejudicado, pois com os curtos intervalos de aplicações dos fungicidas durante os ciclos das culturas, reduz-se a sobrevivência da espécie de fungo controlador (AMORIM *et al.*, 2018).

O fitopatógeno *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary pertence ao filo Ascomycota (AMORIM, *et al.*, 2016) classe Discomycetes, ordem *Helotiales* e família *Sclerotiniaceae* (HEFFER LINK; JOHNSON, 2012). Esse fungo pode infectar mais de 400 espécies de plantas, ocasionando a doença popularmente conhecida como mofo branco. Além disso, é adaptado a diferentes regiões, e está distribuído mundialmente (BOLAND; HALL, 1994; BOLTON *et al.*, 2006).

Este fungo tem a capacidade de formar estruturas de resistência, que são denominadas escleródios. Os escleródios têm uma casca exterior dura e parda com um interior branco a bege claro, apresentam uma forma irregular e geralmente medem 2 a 5 mm de diâmetro e 25 mm de comprimento. Essas estruturas podem permanecer no solo por cerca de oito anos, sem perder a sua viabilidade (AGRIOS, 2005; HEFFER LINK ; JOHNSON, 2012). Os escleródios podem germinar na forma micelial ou produzir apotécios de 4 até 10 mm de diâmetro, com ascos cilíndricos medindo de 2 a 10 µm de diâmetro e entre 110 a 155 µm de comprimento, os quais podem liberar cerca de 10 milhões de ascósporos que tem forma elipsoidais e são hialinos (HEFFER LINK ; JOHNSON, 2012; AMORIM, *et al.*, 2016).

As plantas infectadas apresentam lesões como manchas encharcadas de água que se expandem irregular e indeterminadamente. A partir do momento em que as lesões aumentam, as hastes afetadas podem ser cimentadas (marrom-escura), o que faz com que porções da planta murchem e então se tornem necróticas (AGRIOS, 2005). Os tecidos afetados podem desenvolver uma consistência aquosa e um micélio branco e grosso sem forma, sendo que esse pode permanecer dentro ou fora dos tecidos das plantas. Com o tempo, os tecidos vegetais dessecados aparecem clareados comparados com aqueles que envelhecem normalmente (HEFFER LINK; JOHNSON, 2012).

Os escleródios do fungo podem ser formados internamente na medula do tronco, assim como também podem ser formadas na parte externa da haste. Em folhas e pecíolos de plantas, tais como alface e beterraba, se ocorrer um ataque súbito, a planta pode morrer facilmente, pois o fungo infecta a base do caule e folhas inferiores (AGRIOS, 2005).

O micélio fúngico e os escleródios sob condições de umidade, o que facilita o desenvolvimento do fungo com mais facilidade e invade a planta por inteiro. Desse modo, faz

com que a planta apodreça, produzindo um mofo branco, ou seja, o micélio ao longo de toda a planta (BOLAND; HALL, 1994). Essa doença tem seu desenvolvimento em uma grande faixa de temperatura, desde 5°C até 30°C, no entanto, é mais expressivo aos 25°C. Além disso, a umidade do solo é um fator determinante para o desenvolvimento (AMORIM, *et al.*, 2016).

2.3 CONTROLE DO FUNGO *Sclerotinia sclerotiorum*

Os patógenos veiculados pelo solo geralmente são de difícil controle, pois a eficiência dos produtos aplicados é prejudicada pelo fato dos mesmos não atingirem os escleródios que ficam no solo como exemplo do gênero *Sclerotinia* e *Sclerotium* (AMORIM *et al.*, 2018). Dessa forma, os métodos de controle devem ser preventivos, evitando a entrada do patógeno na área de cultivo, através do uso de sementes certificadas, cuidados com a limpeza dos equipamentos, entre outros (AMORIM *et al.*, 2016).

Também pode ser utilizado como medida de controle a rotação de culturas com a utilização de gramíneas, pois estas não são hospedeiras desse patógeno. Com isso, a formação de palhadas irá proporcionar menor quantidade de luz no solo, e não permitirá a produção de apotécios, que precisam de luz para germinarem (GORGEN *et al.*, 2009).

Há estudos com a utilização de fungicidas, como o realizado por Muller *et al.* (2002 e Zancan (2011), no qual avaliaram a eficiência dos fungicidas procimidone e fluazinam na inibição de *S. sclerotiorum* em sementes de feijão. Os produtos mostraram-se eficientes no controle nesse estágio, mas quando o tratamento passou ser no estágio vegetativo do feijoeiro, os resultados encontrados foram inconsistentes no controle, pois a aplicação não atingiu toda a área. SUMIDA *et al.* (2015), estudaram diferentes agentes químicos para o controle do mofo branco *in vitro*, e observaram que os fungicidas a base de fluazinam, cloreto de benzalcônio + fluazinam, iprodione e carbendazim exibiram maiores porcentagens de inibição de escleródios, sendo de em 63,9%, 61,8%, 46,5% e 44,4%, respectivamente, assim como Vieira *et al.* (2001), que observaram uma menor incidência de mofo branco no feijoeiro, quando aplicado fluazinam e benomyl, tanto na água de irrigação, como na aplicação por pulverização.

2.4 CONTROLE BIOLÓGICO

O controle biológico de doenças de plantas pode ser conceituado como sendo o controle de microrganismos por ação de outros microrganismos. Contudo, deve-se conhecer as características dos patógenos, relacionadas ao crescimento, virulência, agressividade e reprodução, para assim encontrar um antagonista que seja capaz de intervir nos processos vitais dos patógenos (ZAMBOLIM *et al.*, 2014; MEYER, *et al.*, 2019).

Esse tipo de controle pode ser destacado pela eficiência na redução da quantidade e na viabilidade dos inóculos dos microrganismos patogênicos, pois os microrganismos antagonistas apresentam uma capacidade de fixação em ambientes diferentes daqueles dos quais foram isolados, se estabelecendo nas áreas e parasitando os patógenos com facilidade (RUFINO *et al.*, 2018).

O controle de patógenos é uma tarefa difícil, quando se trata de patógenos veiculados pelo solo, pois o controle químico raramente leva a resultados satisfatórios, pelo fato dos produtos não atingirem todo o solo (ZAMBOLIM, 2014). Além disso, os pesticidas químicos representam riscos para a saúde, levam à redução da microflora benéfica do solo e aumentam os custos de produção (FAHMI *et al.*, 2012). Nesse contexto, o controle biológico de doenças de plantas utilizando antagonistas já demonstrou bons resultados no Brasil, assim como em outros países com mais tradição nessa prática, como EUA, Canadá, Austrália e França, onde já foram observadas espécies de fungos, bactérias, insetos e outros organismos que foram eficientes em parasitar ou interagir com o crescimento de *Sclerotinia* spp. (CAMPANHOLA ; BETTIOL 2003; AGRIOS, 2005).

O controle biológico vem sendo cada vez mais procurado pelos produtores. Os biofungicidas no Brasil tiveram um incremento de 148% em relação ao uso no ano de 2018, demonstrando a tendência da adoção dessa tecnologia por parte dos produtores (MAYER *et al.*, 2019). O controle biológico apresenta baixo impacto no meio ambiente, não deixa resíduos tóxicos nos alimentos e é totalmente compatível com outras medidas de controle, como o método cultural, no qual são retirados manualmente as plantas com sinais do patógeno (MARQUES *et al.*, 2018).

Contudo, os produtos a base de fungos antagonistas devem possuir cepas que tenham uma atividade eficiente contra os patógenos que se deseja controlar. Além disso, devem ser adaptados às condições ambientais sob as quais irão ser aplicados (MARQUES *et al.*, 2016). Também, esse tipo de controle é mais utilizado e aplicado para doenças radiculares,

principalmente as causadas por fungos e nematoides, sendo que alguns patógenos podem estar associados as sementes e ocasionar a infecção logo nos primeiros estádios de desenvolvimento da cultura (AMORIM *et al.*, 2018).

A eficiência do controle biológico à patógenos do solo ocorre pela introdução de antagonistas, sendo que esses podem estar inseridos nos órgãos de propagação de plantas ou inseridos diretamente no solo (ZAMBOLIM *et al.*, 2014). Segundo Perkins (1984) e Pacheco (2012), pode-se ter diferentes mecanismos de ação para o biocontrole de fitopatógenos, tais como a competição, predação, mutualismo, parasitismo e indução de resistência na planta hospedeira.

No Brasil estão registrados 25 produtos para controle biológico de *S. sclerotiorum*, sendo que todos apresentam na formulação a espécie de *Trichoderma* e pelo menos oito produtos são indicados para a cultura do feijoeiro (AGROFIT, 2021). O sucesso de fungos no biocontrole de patógenos, se dá por possuírem diferentes estratégias para antagonismo e efeitos indiretos sobre a sanidade das plantas, pois colonizam o sistema radicular, resultando no aumento e desenvolvimento de sistemas radiculares, aéreos e produção das culturas. Além disso, pode atuar como indutor de resistência sistêmica de plantas (HYDER *et al.*, 2017).

O uso de fungos do gênero *Trichoderma* é uma prática conhecida pelos produtores, principalmente para o controle do fungo *S. sclerotiorum*. As espécies de *Trichoderma* tem grande capacidade de parasitar esse patógeno, mas pode ocorrer em muitas situações um erro na aplicação desse produto, já que este não é compatível com os fungicidas aplicados durante o ciclo das culturas Assim, o mesmo deixou de ser usado em muitos casos (AMORIM *et al.*, 2018). Desse modo, foi revisto a forma de aplicação do produto e o mesmo passou a ser aplicado no pré-plantio no qual se mostrou mais eficiente. Nesse contexto, torna-se necessário manter um fluxo contínuo de coleta, isolamento, avaliação e caracterização de agentes de biocontrole para melhorar e manter sua eficiência e que possa melhorar os produtos que já estão no mercado (LOPES *et al.*, 2013).

Trabalhos mostram resultados promissores no controle de doenças com o uso de *Trichoderma*, como os resultados encontrados por Khang (2013), contra os patógenos *R. solani*, *Fusarium moniliforme* e *Phytophthora capsici*. Outros resultados foram obtidos por Rey *et al.* (2000), no qual mutantes foram desenvolvidos para melhorar o controle biológico e o potencial de *Trichoderma* sp., aumentando a produção de metabólitos e o potencial antagônico. Além disso, foi encontrado inibição do crescimento de *Pythium* sp. devido ao metabólito volátil produzido por *Trichoderma* sp. (PATIL *et al.*, 2012)

Resultados que podem impulsionar o controle biológico das doenças causadas por *Sclerotinia*. em algumas culturas, foram obtidos através da incorporação dos fungos micoparasíticos como exemplos o *Coniothyrium minitans*, *Gliocladium roseum* e *Trichoderma viride* em solos infestados por *Sclerotinia*. A aplicação desses fungos micoparasíticos comprometem a presença de escleródios existentes ou inibem a formação de novos escleródios pelo fungo, assim reduzem a presença do fungo na área ao longo do tempo (AGRIOS, 2005).

2.5 SUBSTRATOS PARA PRODUÇÃO DE FUNGOS ANTAGONISTAS

Quando se deseja trabalhar com a produção de fungos em larga escala, deve-se buscar por meios de cultivo que sejam nutritivos para que tenham um bom desenvolvimento e esporulação tanto em meio líquido, quanto para meio sólido. Nesse último, a proporção carbono e nitrogênio (C:N) é um fator importante que deve ser considerado no desenvolvimento de meios de cultura, pois sua composição pode ter uma estreita relação com o custo e a qualidade do fungo produzido, podendo influenciar no tipo, formato e quantidade de propágulo, sendo que meios ricos em C, mas deficientes em N, tendem a produzir maior quantidade de conídios (LEITE *et al.*, 2003).

Outro fator de relevância que se deve ter cuidado no momento da preparação dos meios é a umidade. Segundo Pandey (2003), alta umidade resulta numa diminuição da porosidade do substrato, a qual impede a penetração do oxigênio, enquanto um baixo conteúdo de umidade pode levar a uma pobre disponibilidade dos nutrientes, comprometendo o crescimento microbiano, contudo esse conteúdo de umidade é algo difícil de se otimizar, pois pode ser complexa dependendo do organismo com o qual se trabalha (JENKINS *et al.*, 1998). Além disso, a aeração é outro fator a ser considerado para a produção dos meios. De acordo com Lonsane *et al.* (1985), a utilização de um substrato fibroso favorece a aeração, causa menores problemas de compactação e maior superfície de crescimento durante um cultivo em substrato sólido.

O meio líquido apresenta como principais vantagens uma maior facilidade de padronização do processo, além de permitir uma multiplicação de propágulos em um menor período. Porém, a produção de esporos por esse processo ainda constitui um desafio, principalmente devido à dificuldade de induzir a produção de conídios submersos dos fungos (MORANDI *et al.*, 2007). O suco V8, composto por 8 vegetais em sua composição, apresenta

uma base eficiente na adaptação para o crescimento dos fungos e a adição do melado de cana, complementa o meio, pois sua composição é de cerca de 50% de açúcares e 3% de matérias nitrogenadas (HARMAM *et al.*, 1991; LIMA *et al.*, 2001).

O meio líquido para produção de conídios, já é uma técnica antiga com a utilização do suco V8, por apresentar em sua composição diferentes nutrientes que possam suprir as necessidades de cada microrganismo, assim obtendo bons resultados (JIN *et al.*, 1996). Já estudos mais recentes vêm aperfeiçoando meios líquidos, utilizando meios de baixo custo, com boa eficiência e que dependam de pouca mão de obra (KOBORI *et al.*, 2015).

Estudos com o uso de substratos para diferentes fungos, torna-se de grande relevância para a produção massal de novos agentes, uma vez que não há um estudo com parâmetros ótimos aplicáveis para todas as espécies, assim cada isolado apresenta seus requerimentos específicos para a formação de conídios (STEYART *et al.*, 2010).

3 METODOLOGIA

3.1 CARACTERIZAÇÃO DA ÁREA E PROCEDÊNCIA DOS FUNGOS BIOCONTROLADORES

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Fitopatologia da Universidade Federal de Santa Catarina, Campus de Curitibanos/SC e na propriedade de André Luiz Graf, no município de Monte Castelo/SC (26°27'11.60"S e 50°13'14.75"O). Os isolados dos fungos com potencial biocontrolador estão armazenados, pelo método de Castellani (FIGUEIREDO, 1967), na micoteca do Campus de Curitibanos da UFSC. Esses isolados foram obtidos de solo de pastagem, floresta e cultivo de soja no município de Brunópolis/SC em 2017 (MEDRADO, 2019), e estão identificados na micoteca com códigos SC, seguidos de quatro dígitos de identificação, como exemplo SC1291.

3.2 REATIVAÇÃO DOS MICRORGANISMOS

Para este ensaio foram utilizados 18 isolados (item 3.1), aleatoriamente, atendendo todas as classes de controladores para *S. sclerotiorum*, conforme estudo realizado por Medrado (2019) e que permanece armazenados pelo método de Castellani em condições ambientais, em frascos de penicilina. Posteriormente, foram repicados em meio de cultura BDA (Batata-Dextrose-Ágar) com antibiótico (estreptomicina e penicilina) 500 mg L⁻¹ colocando-se um disco de micélio (5 mm de diâmetro) no centro das placas de Petri. As placas foram então vedadas com filme plástico e incubadas em câmara de crescimento a 25°C e fotoperíodo de 12 horas. Após 24 horas da incubação, foi realizada avaliação qualitativa (FINATTI ; APARECIDO, 2009) dos isolados, a fim de verificar o desenvolvimento micelial dos fungos.

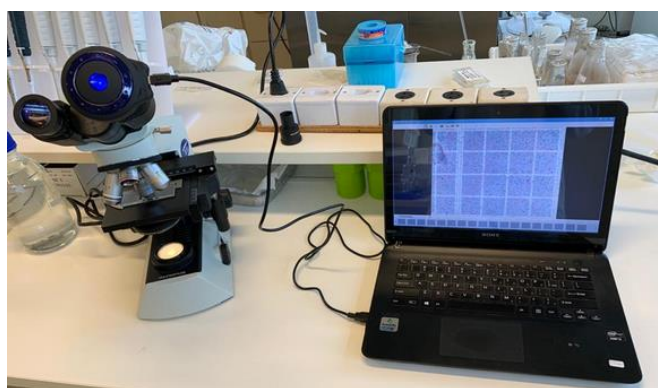
3.3 PRODUÇÃO DE CONÍDIOS DOS FUNGOS EM MEIO LÍQUIDO

Para verificar a produção de conídios pelos fungos, foram utilizados os seguintes meios em líquido com diferentes combinações: **T1** (V8 : melado : KNO₃ : K₂SO₄) (p:p:p), **T2** (V8 : melado : (NH₄) NO₃) (p:p:p) e **T3** (V8 : melado : (NH₄) : ₂SO₄) (p:p:p), sendo o V8 a

base do produto (HARMAM *et al.*, 1991), o melado a fonte de carbono e os sais, como fonte de nitrogênio. (Adaptado de MONTOYA-GONZALEZ *et al.*, 2016).

Após a formulação dos tratamentos, os meios foram adicionados em tubos de ensaio (10 mL) e incubados a 25°C com fotoperíodo de 12 horas. Para a avaliação da produção de biomassa dos conídios, foram realizadas amostras aos sete dias após a inoculação (MONTOYA-GONZALEZ *et al.*, 2016). Para isto, foram adicionados a 20 mL de água, agitados manualmente, para desmembrar os conídios das partículas dos substratos, e com o auxílio de uma pipeta, foi coletada 1 mL e observado a contagem em câmara de Neubauer (KOIKE; LUCON, 2003; MUNIZ *et al.*, 2018). Para a contagem, foi acoplado uma câmera ao microscópio de luz (Figura 1), junto ao software Future WinJoe®.

Figura 1 - Câmera acoplada ao microscópio de luz para a observação dos conídios.



Fonte: Autor, 2020.

Posteriormente as imagens obtidas foram tratadas no software GIMP versão 2.10.14, onde foram marcados os conídios, em seguida, foram quantificados e tabelados com auxílio do pacote EBIImage do software R. Os resultados foram expressos como quantidade de conídios por mililitro (conídios/mL), considerado resultados satisfatórios a partir de 10^8 conídios/mL de substrato (SANTORO *et al.*, 2005).

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado e composto por três tratamentos com três repetições. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e teste de média Tukey a 5% de probabilidade de erro no software R.

3.4 PRODUÇÃO DE CONÍDIOS DOS FUNGOS EM MEIO SÓLIDO

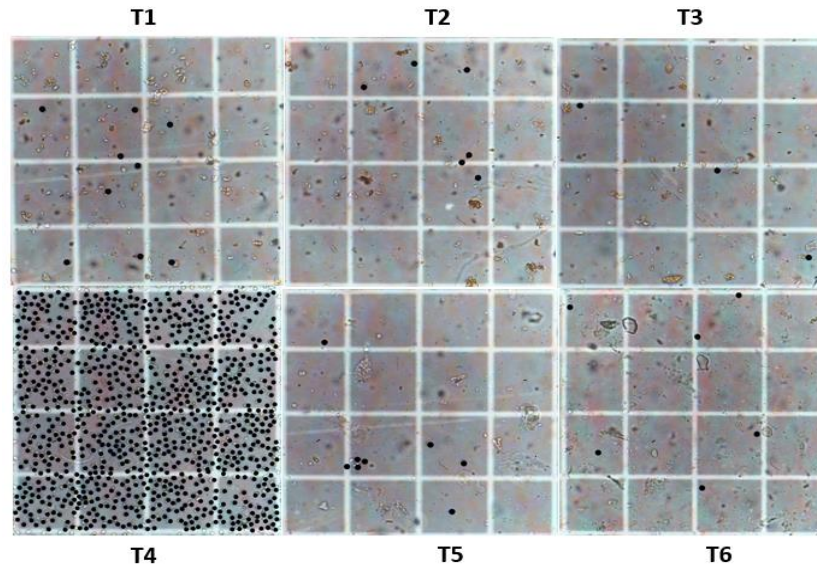
Os 18 isolados, foram repicados em meio BDA para sua ativação, onde um disco (5 mm) foi transferido para placa de Petri e incubado por 7 dias, ou até que fosse observado a

formação dos conídios, em incubadora a 25°C, com fotoperíodo de 12 horas. Para testar a produção de conídios pelos fungos foram utilizados os seguintes meios: arroz parboilizado (T4), farelo de milho (T5) e farelo de trigo (T6). A umidificação dos substratos foi realizada pela imersão de 10 g de cada substrato em 10 mL de água destilada no arroz e 20 mL, para farelo de trigo e milho (adaptado de Cavalcante *et al.*, 2007). O meio líquido, foi feito sem adição externa de nutrientes para equilibrar a relação C:N. Os substratos foram esterilizados em autoclave a 121°C por 15 minutos e deixados resfriar. Em câmara de fluxo laminar, com o auxílio de um bastão de vidro estéril, foi feita a desagregação dos meios sólidos para permitir que o fungo se desenvolvesse uniformemente sobre todo o substrato e em seguida foi realizado o processo da inoculação dos discos com os isolados (SENE *et al.*, 2010).

Posteriormente, foram adicionados discos (5 mm) contendo micélio dos fungos a serem cultivados, estes foram colocados diretamente sobre os meios. Após a adição do inóculo, os frascos foram vedados com papel alumínio e plástico filme e ficaram incubados por sete dias 25°C, com fotoperíodo de 12 horas (KOIKE; LUCON, 2003).

Finalizado o prazo estipulado de sete dias, foram adicionados a 100 mL de água destilada nos substratos, agitados manualmente para que houvesse a desagregação dos conídios do meio. Posteriormente foram filtrados em gase e com uma pipeta a alíquota foi retirada e observados para a contagem em câmara de Neubauer (KOIKE; LUCON, 2003; Adaptado MUNIZ *et al.*, 2018). Para a contagem, foi utilizado o método citado no item 5.3, indicado por Santoro *et al.*(2005).

Figura 2 – Imagem capturadas do isolado SC1152, em câmara de Neubauer para contagem dos conídios obtidos nos tratamentos T1 (V8 : melado : KNO₃ : K₂SO₄), T2 (V8 : melado : (NH₄) NO₃) e T3 (V8 : melado : (NH₄) : 2SO₄), (T4) arroz parboilizado, (T5) farelo de milho e (T6) farelo de trigo.



Fonte: Autor, 2021.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado e composto por três tratamentos com três repetições. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e teste de média Tukey a 5% de probabilidade no software R.

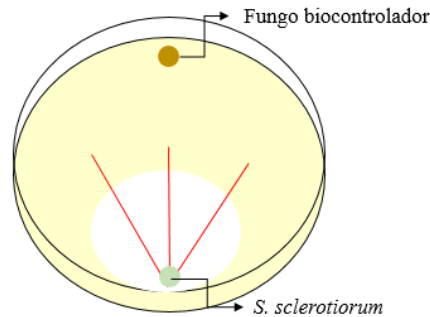
3.5 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOCONTROLADOR *in vitro*

Os isolados SC1157, SC1178, SC1170 e SC1206, que são biocontroladores por antibiose, conforme Medrado (2019), e que apresentaram produção de conídios acima de 10^6 conídios.mL⁻¹, quando cultivados nos diferentes substratos, foram avaliados, pela técnica de cultura pareada, para o controle de *S. sclerotiorum*.

Disco de micélio (5 mm) de *S. sclerotiorum* foi repicado em uma extremidade da placa de Petri contendo meio de cultura BDA e na outra extremidade, um disco de 5 mm do fungo biocontrolador (Adaptado de MELO; VALARINI, 1995). As placas foram identificadas, vedadas e incubadas em BOD com fotoperíodo de 12 h e temperatura de 25°C.

As avaliações iniciaram após 24 horas da instalação do experimento. Para tanto, foram efetuadas medições diárias do diâmetro das colônias, em três sentidos diametralmente opostos (Figura 3), com auxílio de uma régua, calculando-se uma média para cada colônia (Adaptado de MELO; VALARINI, 1995).

Figura 3- Esquema de medições do diâmetro das colônias, em três sentidos diametralmente opostos do disco do fungo *Sclerotinia sclerotiorum* utilizadas para obtenção dos dados de crescimento.



Fonte: Autor, 2021

Com os dados obtidos referentes ao crescimento dos fungos, medidos em centímetros, dentro de cada repetição e para cada um dos tratamentos, foram calculados o Índice de Velocidade do Crescimento Micelial (IVCM) e a Área Abaixo da Curva de Crescimento Micelial (AACCM).

Para o IVCM, o cálculo foi realizado pela fórmula de Maguire (1962) e adaptada por Oliveira (1992):

$$\text{IVCM} = \frac{\sum \frac{(y_{i+1} - y_i)}{(t_{i+1} - t_i)}}{(n-1)} \quad (\text{I})$$

A avaliação da AACCM foi obtida através da aplicação da equação proposta por Campbell e Madden (1990):

$$\text{AACCM} = \sum \left(\frac{y_{i+1} + y_i}{2} \right) \cdot (t_{i+1} - t_i) \quad (\text{II})$$

Para ambas as equações, y_i e y_{i+1} são os valores médios do diâmetro da colônia observados em duas avaliações consecutivas; t_{i+1} e t_i são os períodos das avaliações e n é o número de avaliações.

Com os dados de AACCM e IVCM, foi calculado a percentagem de inibição do crescimento micelial (PIC) pela fórmula de Menten *et al.* (1976),

$$\text{PIC} = \frac{\text{média testemunha} - \text{média tratamento}}{\text{média testemunha}} \times 100 \quad (\text{III})$$

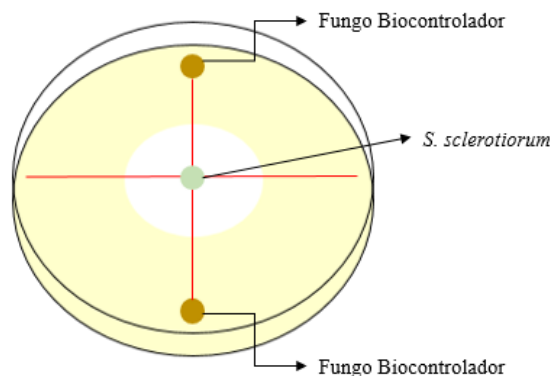
Os tratamentos que não apresentaram inibição de crescimento receberam valor igual a zero (MENTEN *et al.*,1976).

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado e composto por cinco tratamentos (quatro biocontroladores e uma testemunha composta apenas pelo disco de micélio de *S. sclerotiorum*) e cinco repetições. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e ao teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade no software R.

Para os fungos que possuem biocontrole do tipo competidor (SC1152, SC1161, SC1259, SC1279, SC1251, SC1291, SC1278, SC1244 e SC1168) conforme Medrado (2019) e que apresentaram produção de conídios quando cultivados nos diferentes substratos testados, o ensaio foi realizado por pareamento em placas de Petri contendo meio BDA. Para tanto, dois discos de micélio com 5 mm de diâmetro do antagonista foram inoculados nas extremidades do meio de cultura contendo um disco micelial de mesmo diâmetro do fitopatógeno no centro da placa (Figura 4) (BELL *et al.*, 1982, adaptado por MEDRADO, 2019).

As placas foram identificadas, vedadas e incubadas em BOD com fotoperíodo de 12 h e temperatura de 25°C. As avaliações foram iniciadas após 24 horas da instalação do experimento, onde foram obtidas as medidas de duas retas perpendiculares intersectadas no centro do disco do fungo *S. sclerotiorum* (Figura 4).

Figura 4- Esquema de duas retas perpendiculares intersectadas no centro do disco do fungo *Sclerotinia sclerotiorum* utilizadas para obtenção dos dados de crescimento.



Fonte: Autor, 2021

Com os dados obtidos referentes ao crescimento dos fungos, medidos em centímetros, dentro cada repetição e para cada um dos tratamentos, foram calculados o Índice

de Velocidade do Crescimento Micelial (IVCM) e a Área Abaixo da Curva de Crescimento Micelial (AACCM).

Para o IVCM, o cálculo foi realizado pela fórmula (I) de Maguire (1962) e adaptada por Oliveira (1992) e para a avaliação da AACCM foi obtida através da aplicação da equação (II) proposta por Campbell e Madden (1990), ambas citadas anteriormente.

Com os dados de AACCM e IVCM, foi calculado a percentagem de inibição do crescimento micelial (PIC) pela fórmula (III) de Menten *et al.* (1976),

Os tratamentos que não apresentaram inibição de crescimento receberam valor igual a zero (MENTEN *et al.*, 1976).

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado e composto por dez tratamentos (nove biocontroladores e uma testemunha) e cinco repetições. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e ao teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade no software R.

3.6 AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DOS FUNGOS BIOCOTROLADORES NA CULTURA DO FEIJOEIRO EM CONDIÇÕES DE CAMPO

Este ensaio foi realizado na propriedade do Sr. André Luiz Graf, (26°27'11.60"S e 50°13'14.75"O com altitude de 820 m.), localizado na cidade de Monte Castelo, Santa Catarina. A temperatura média é de 16,9°C. O solo da área utilizada para o experimento é classificado como Latossolo Vermelho-Escuro (EMBRAPA, 2004) com textura argilosa, e as seguintes características: pH 6,1; 6,6, 3,57, 0,1 e 4,61 cmol dm⁻³ Ca, Mg, Al e H + Al, respectivamente e 9,54 mg dm⁻³ de P e 109,48, 1,1, 3,95, 30,29 e 9,4 cmol dm⁻³ K, Cu, Zn, Fe e Mn, respectivamente; e 27,68 g dm⁻³ de matéria orgânica. A área experimental havia sido cultivada com pastagem perene e não havia registro de safra anual anterior.

O preparo do solo foi feito com subsolador hidráulico de cinco hastes. Após sete dias, foi realizado o preparo dos blocos com auxílio de enxadas e pá, além da colocação de madeira para a separação e contenção do solo entre as parcelas. Posteriormente ao preparo, a área experimental foi adubada com N - P₂O₅ - K₂O (8-20-20 a 625 kg.ha⁻¹), seguido da semeadura de feijão da variedade “uirapuru”, sendo semeada 24 sementes por metro quadrado.

Após o estabelecimento do estande da cultura, foi realizada a distribuição dos escleródios na área experimental, com média de 145 escleródios (produzidos em meio BDA,

em um período de 30 dias) por metro quadrado conforme descrito por Huang *et al.* (2000). Para proporcionar microclima propício a doença, os experimentos foram irrigados por aspersão, favorecendo o crescimento adequado do feijoeiro. Outras práticas culturais seguiram as recomendações de Barbosa e Gonzaga (2012).

Para esse ensaio, foi produzido o inóculo dos fungos com potencial biocontrolador do tipo competidor (SC 1259 e SC 1152) e do tipo antibiose (SC 1206 e SC 1170) em sacos plásticos com 150 g de arroz parboilizado (Figura 5). Para tanto, cinco discos miceliais de 5 mm de cada isolado foram transferidos para o arroz parboilizado, previamente umedecido e autoclavado (121°C por 15 min). As embalagens foram mantidas a 25±2°C. Após sete dias, foi adicionado água sobre os substratos, agitados e filtrados em gaze estéril, e sua concentração foi ajustada para 10⁶ conídios.ml⁻¹ (CARVALHO *et al.*, 2015).

Figura 5 - Arroz parboilizado colonizado por fungo biocontroladores



Fonte: Autor, 2020.

As aplicações durante o ciclo da cultura, foram realizadas em duas etapas: A primeira aplicação foi com o início da floração da cultura aos 55 dias após a semeadura e a segunda, 10 dias após a primeira (HUANG *et al.*, 2000) usando 1,0 L da suspensão de conídios 10⁶ conídios.ha⁻¹ dos fungos com potencial biocontrolador, por parcela. Para a pulverização das suspensões de conídios, foi utilizado pulverizador de pré-compressão, modelo XP-20 (Jacto), com volume real do tanque de 20 L. Após a aplicação dos fungos com potencial biocontrolador, os experimentos foram irrigados para facilitar a disseminação dos conídios no solo.

A avaliação da severidade do mofo branco foi avaliada a partir da fase reprodutiva do enchimento dos grãos aos 64, 75, 85, 93 e até o momento da colheita, (103 DAS) (dias após semeadura). Para tanto, foi baseada na escala de classificação descrita por Napoleão *et al.* (2005), na qual são atribuídas notas de 1-6 de acordo com a severidade, onde: nota 1 = planta aparentemente sadia; nota 2 = 1% a 5% da planta atacada; nota 3 = 6% a 20% da planta atacada; nota 4 = 21% a 50% da planta atacada; nota 5 = mais de 50% da planta atacada; e nota 6 = planta morta. Para análise, foi considerada a pontuação média de cada nota atribuída.

Além disso, foram analisados o número de apotécios presentes na superfície do solo no estágio de floração plena e na colheita, a altura das plantas, comprimento das raízes e o número de vagens por planta, nas 10 plantas centrais de cada parcela.

O delineamento experimental foi realizado em blocos ao acaso com quatro repetições, sendo as parcelas constituídas por cinco linhas de plantio de dois metros. O espaçamento entre linhas foi de 0,5 m, enquanto as parcelas foram espaçadas de 1,0 m (Figura 6).

Figura 6- Esquema da experimentação em campo com quatro fungos biocontroladores de *Sclerotinia sclerotiorum* na cultura do feijoeiro, na cidade de Monte Castelo/SC.



Fonte: Autor, 2021.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 REATIVAÇÃO DOS MICRORGANISMOS

A reativação dos isolados que estavam armazenados em método de Castellani, mostrou resultados positivos, pois os 18 isolados apresentaram-se eficientes, ou seja, após o tempo de armazenamento (6-9 meses), sendo colocados em meio BDA, tiveram o seu desenvolvimento micelial, resultados como esse, são importantes, pois quando se trabalha com fungos com potencial antagonista, necessitam de períodos de armazenamento para facilitar os estudos com os mesmos.

O método de Castellani é amplamente utilizado por apresentar fácil execução, ser menos custoso e por possuir uma recuperação significativa dos microrganismos estocados. Outras vantagens dessa técnica é que não necessita da realização de repiques contínuos, qual pode levar a contaminação, além de que muitas cepas fúngicas podem perder suas características macroscópicas, voltando a apresentá-las após a conservação em água destilada (CASTELLANI, 1963).

Pelas vantagens que o método de armazenamento em Castellani apresenta, essa técnica já é utilizada a muitos anos apresentando eficiência. Estudos que apoiam esse método de conservação é o de Capriles *et al.* (1989), onde avaliaram o armazenamento de 594 cepas de diferentes espécies fúngicas por um período de 20 anos, das quais 62% apresentavam viabilidade quando colocadas em meio de cultivo para crescimento.

Passador *et al.* (2010); Figueiredo e Camilo (2013) observaram resultados positivos com o emprego da técnica de armazenamento de fungos fitopatogênicos. Após o período de armazenagem, os isolados avaliados por esses autores não perderam a sua viabilidade e nem a patogenicidade que apresentavam antes de serem armazenados, provando que essa técnica não muda o comportamento dos organismos.

Trabalhos como esses corroboram com os resultados encontrados, pois apesar do período menor de armazenamento, os fungos antagonistas permaneceram viáveis e com o potencial antagonista ativo.

4.2 PRODUÇÃO DE CONÍDIOS DOS FUNGOS EM MEIO LÍQUIDO E SÓLIDO.

Todos os substratos foram viáveis para ao menos um microrganismo (Figura 7), tanto os utilizados para meio líquido, quanto os substratos utilizados para meio sólido. Dos 18 isolados colocados para crescimento, apenas cinco não tiveram seu crescimento e desenvolvimento em nenhum dos substratos, ou seja, nenhum meio foi capaz de estimular a produção de conídios desses isolados, três deles eram antagonistas do tipo antibiose e dois do tipo competidor (Tabela 1). Os grãos de cereais geralmente oferecem vantagens de disponibilidade, custo, rendimento e praticidade para cultivo de bioagentes, sendo, deste modo, os mais utilizados (THANGAVELU *et al.*, 2004; FORTES *et al.*, 2007).

Figura 7 - Crescimento do isolado fúngico em todos os tratamentos com meios líquidos e sólidos.



Fonte: Autor, 2020.

Legenda: Tratamentos: **T1** (V8 : melado : KNO_3 : K_2SO_4), **T2** (V8 : melado : $(\text{NH}_4)\text{NO}_3$), **T3** (V8 : melado : $(\text{NH}_4) : 2\text{SO}_4$), **T4** (arroz parboilizado), **T5** (farelo de milho) e **T6** (farelo de trigo).

Tabela 1- Isolados fúngicos testados em diferentes substratos para produção de conídios

Fungo	Competidor	Antibiose	Classificação	Substrato viável
SC1157		x	1 ^a	Todos
SC1178		x	3 ^a	Todos
SC1251	x		3 ^a	Todos
SC1279	x		5 ^a	Todos
SC1291	x		2 ^a	Todos
SC1170		x	2 ^a	Todos
SC1221		x	3 ^a	Nenhum
SC1161	x		3 ^a	Todos
SC1283	x		4 ^a	Nenhum
SC1206		x	1 ^a	T2;T3;T4;T5 e T6
SC1259	x		2 ^a	Todos
SC1224		x	3 ^a	Nenhum
SC1278	x		4 ^a	T2; T4;T5 e T6
SC1190		x	4 ^a	Nenhum
SC1166	x		4 ^a	Nenhum
SC1244	x		3 ^a	T1;T2;T4;T4;T5 e T6
SC1168	x		3 ^a	T1; T4 e T5
SC1152	x		1 ^a	Todos

Fonte: Medrado (2019); Autor, 2020.

Legenda: Competidor e Antibiose, refere-se ao tipo de controle que os fungos biocontroladores exercem sobre o patógeno *Sclerotinia sclerotiorum*; Classificação, refere-se a ordem de escolha aleatória dos fungos trabalhados por Medrado (2019); os substratos viáveis, refere-se aos tratamentos: **T1** (V8 : melado : KNO₃ : K₂SO₄), **T2** (V8 : melado : (NH₄) NO₃), **T3** (V8 : melado : (NH₄) : 2SO₄), **T4** (arroz parboilizado), **T5** (farelo de milho e **T6** (farelo de trigo).

Na Tabela 2 constam os dados de produção e pode-se observar a quantidade de conídios produzidos por cada isolado em cada substrato. Os resultados se mostraram positivos para os isolados testados, dando destaque para o tratamento T3 (meio líquido - V8 / melado / (NH₄) • 2SO₄), que se apresentou como o melhor substrato líquido para produção de conídios, onde foi possível para o isolado SC1161 uma produção de 1,60 x 10⁹ conídios/ml. No entanto, quatro dos isolados não se adaptaram a esse substrato, não apresentando produção de conídios.

Para a produção de conídios em meio sólido, o tratamento T4 (arroz parboilizado) foi o melhor substrato, sendo diferente estatisticamente entre todos os substratos. Além disso, todos os isolados produziram conídios quando colocados para crescimento nesse meio, ademais o isolado SC1152 teve a maior produção de conídios, sendo de 2,34 x 10⁹ conídios/ml.

Quanto a produção de conídios dos demais isolados, o fato de não apresentarem uma grande quantidade pode estar relacionada à qualidade nutricional do meio, mas ainda que existam estudos sobre fatores nutricionais, físicos, químicos e biológicos envolvidos no processo de esporulação, não há um conjunto de parâmetros ótimos e gerais aplicáveis para nenhuma espécie de fungo, podendo inclusive estar relacionado aos requerimentos específicos de cada isolado dentro das espécies fúngicas de interesse (STEYART *et al.*, 2010). O que explica a variação da produção de cada isolado trabalhado em cada meio, tanto em meio líquido como em meio sólido.

Cavalcante *et al.* (2007) avaliaram a produção de conídios de diferentes espécies de *Trichoderma* em meio sólido em farelo de milho, farelo de trigo e arroz e a influência da umidade dos substratos em relação a produção de conídios. Diferente dos resultados encontrados neste trabalho, os autores, observaram que o farelo de trigo foi até 75% melhor na produção de conídios dos fungos estudados, quando comparado aos conídios produzidos no farelo de milho ou no arroz. Quanto a produção, as maiores quantidades de conídios produzidos pelos isolados foi de $5,80 \times 10^8$, $7,45 \times 10^8$ e $8,85 \times 10^8$ conídios por grama de substrato para o arroz, farelo de milho e farelo de trigo, respectivamente. Esses resultados, foram diferentes dos encontrados nesse estudo, uma vez que o arroz foi onde teve sua maior produção de $2,34 \times 10^9$, seguido do farelo de milho com $4,94 \times 10^8$ e o farelo de trigo com uma produção de $3,56 \times 10^8$.

Essa diferença pode ser explicada pelos isolados que foram utilizados, uma vez que neste trabalho não foram utilizados apenas fungos do gênero *Trichoderma* e sim fungos de diferentes gêneros e espécies com potencial biocontrolador, o que pode apresentar uma exigência nutricional diferenciada. Dessa forma, não existe uma produção padrão para ser utilizada de forma generalizada.

Tabela 2 – Número total de conídios/ml (10^6) obtidos em substratos de meio líquido e sólido após sete dias de incubação (Temperatura: $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas), de diferentes fungos com potencial biocontrolador.

		Tratamentos						
		T1	T2	T3	T4	T5	T6	
		V8 / melado / $\text{KNO}_3 \cdot \text{K}_2\text{SO}_4$	V8 / melado / $(\text{NH}_4) \text{NO}_3$	V8 / melado / $(\text{NH}_4) \cdot 2\text{SO}_4$	Arroz parboilizado	Farelo de milho	Farelo de trigo	
Fungos	SC1278	0 bA	213,0 aA	0 cA	166,0 cdA	268,0 abA	10,2 aA	110,0 b
	SC1279	9,3 bA	7,5 aA	11,1 cA	11,1 dA	66,7 abA	23,6 aA	21,6 b
	SC1168	88,0 abA	0 aA	0 cA	66,2 dA	76,9 abA	0 aA	38,5 b
	SC1291	32,0 abA	24,4 aA	126,0 bcA	43,6 dA	3,56 bA	88,9 aA	53,1 b
	SC1170	104,0 abA	79,1 aA	312,0 bcA	140,0 cdA	192,0 abA	103,0 aA	155,0 b
	SC1152	198,0 abB	164,0 aB	36,4 cB	2340,0 aA	12,0 bB	28,4 aB	463,0 a
	SC1157	33,3 abA	33,8 aA	95,1 bcA	48,4 dA	73,8 abA	43,6 aA	54,1 b
	SC1178	26,2 abA	19,1 aA	28,4 cA	16,4 dA	29,8 bA	75,1 aA	31,3 b
	SC1206	0 bA	38,2 aA	292,0 bcA	117,0 cdA	65,3 abA	49,3 aA	144,0 b
	SC1161	365,0 abCD	126,0 aCD	1600,0 aA	961,0 bB	494,0 aC	52,9 aD	551,0 a
	SC1244	10,2 bA	71,1 aA	0 cA	14,2 dA	110,0 abA	85,0 aA	479,0 b
	SC1251	0 bA	0 aA	0 cA	307,0 cdA	0 bA	0 aA	81,2 b
	SC1259	479,0 aA	361,0 aA	534,0 bA	528,0 bcA	356,0 abA	356,0 aA	430,0 a
			104,0 C	87,5 C	234,0 B	366,0 A	134,0 BC	70,5 C

*Médias com letras iguais, maiúsculas nas linhas e minúsculas nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 5\%$).

Outro relato de que o tratamento com farelo de trigo foi superior ao arroz, casca de noz e serragem na produção de conídios, foram apresentados por Sargin *et al.* (2013), onde os autores observaram uma produção de $1,0 \times 10^{10}$ para isolados de *Trichoderma harzianum* no farelo de trigo, enquanto no farelo de arroz a produção para esse antagonista foi de $9,2 \times 10^9$. O fato de a produção de conídios ser maior em relação aos resultados obtidos neste trabalho, pode estar relacionado não só à preferência do isolado, mas também com o fato de que os autores adicionaram um substrato inerte, o qual proporcionou lacunas e cavidades no meio, facilitando a entrada e circulação de ar e proporcionando maior penetração microbiana.

Muniz *et al.* (2018), ao utilizarem arroz parboilizado para produção em larga escala de isolados fúngicos, observaram uma produção de conídios variando de $0,5 \times 10^8$ a $2,6 \times 10^8$ mL⁻¹, podendo ser considerado como resultados satisfatórios para os isolados em que estavam trabalhando, no entanto, a variação encontrada neste estudo foi maior, estando entre $1,11 \times 10^7$ a $2,34 \times 10^9$, o que pode ser explicado pela variedade de isolados avaliados.

Outro trabalho recente com a utilização de arroz parboilizado, foram realizados por Hewavitharana *et al.* (2018). Além do arroz, os autores utilizaram pó de serra e pó de coco. Como resultados, observaram que o arroz foi inferior ao pó de coco para a produção de conídios dos isolados testados, no entanto os dados foram relatados em unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL) em vez de quantidade de conídios por mililitro, que é um método diferente de expressar a quantidade de conídios produzidos por isolado, ainda que cada conídios, seja uma unidade formadora de colônia, fragmentos de micélio também podem gerar colônias fúngicas e isto não foi analisado nesse trabalho.

Outros estudos encontrados na literatura, com relação a produção de conídios de diferentes fungos e em diferentes formulações de substratos em meio sólido, foram publicados por (LARENA *et al.*, 2004; TEWARI e BHANU, 2004; CHEN *et al.*, 2005; ESSIEN *et al.*, 2005; ZHAO e SHAMON, 2006). Porém, foram realizados em diferentes substratos, que não foram analisados nesse trabalho, ou ainda, os resultados, foram relatados como UFC em vez de quantidade de conídios, tornando a comparação direta inválida.

O meio líquido potencializou a formação de esporos do fungo SC1161 no tratamento T3, tendo uma produção de $1,60 \times 10^9$ conídios por mL. Além disso, esse substrato foi estatisticamente o segundo melhor substrato para formação de conídios segundo o teste de média Tukey 5%. No entanto, os fungos biocontroladores SC1278, SC1168, SC1244 e SC1251 não produziram nenhum conídio nesse meio, indicando assim, que cada fungo tem suas exigências nutricionais particulares e mesmo que o substrato, ou o tipo de meio líquido

ou sólido seja ótimo para um determinado microrganismo, não há garantia de que os mesmos resultados sejam obtidos para outros.

Jin *et al.* (1996), utilizaram o meio V8 para a produção em larga escala de conídios de *T. harzianum* e obtiveram resultados promissores. A formação de conídios no meio ocorreu em níveis máximos dentro de 68 h, além disso, os autores avaliaram a secagem da biomassa, e observaram que quanto maior a adição de glicerol, maior era a tolerância dos conídios à secagem. O peso seco da biomassa aumentou com a duração da fermentação, segundo os autores, assim apresentou maior biomassa após 96 h. No entanto, nenhuma melhoria quanto a produção em volume de conídios

Trabalhos que tiveram uma aprimoração nos estudos em meio líquido, foram realizados por Kobori *et al.* (2015) e por Jackson *et al.* (2015, patente). Esses autores resgataram e aperfeiçoaram o método de produção de conídios em meio líquido, para manipular as condições nutricionais e ambientais durante o crescimento de cepas de *Trichoderma*. Com o objetivo de produzir propágulos usando um meio de baixo custo e com alta eficiência no processo, menor dependência de mão de obra e proporcionando uniformidade e qualidade ao produto mediante controle mais rigoroso dos parâmetros fermentativos.

Além disso, esses trabalhos descrevem a composição e o processo de produção em meio líquido submerso de um propágulo de resistência de *Trichoderma* denominado microescleródio, ainda que não haja relatos sobre a formação dessa estrutura para esses fungos de forma natural. Esse tipo de estudos se caracteriza então como fundamental para novos estudos em relação a fungos utilizados para biocontrole de doenças, bem como os potenciais dos meios de cultivo para esses biocontroladores.

Apesar do suco V8 ser utilizado a décadas, outros meios líquidos vêm sendo estudados para produção de conídios de biocontroladores, como caldo de batata, água de coco, água de arroz lavado e meio seletivo para crescimento de *Trichoderma*, a base de sulfato de magnésio, cloreto de amônio, dextrose, ágar e água destilada (HEWAVITHARANA *et al.*, 2018; KOMALA *et al.*, 2019). Esses meios apresentaram bons resultados na produção de conídios de *Trichoderma* sp. com 10^6 conídios por mL.

Em relação aos substratos avaliados para estimular a produção de conídios dos fungos biocontroladores, todos foram eficientes, contudo, vale ressaltar que se deve ter cuidado na escolha dos substratos, pois não há um ideal que possa ser aplicado de forma padrão para todos os fungos. Assim, deve-se ter conhecimento do microrganismo que se

deseja trabalhar e o material disponível para a tomada de decisão entre o meio líquido ou sólido.

4.3 PERCENTUAL DE INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO MICELIAL DE *Sclerotinia sclerotiorum*

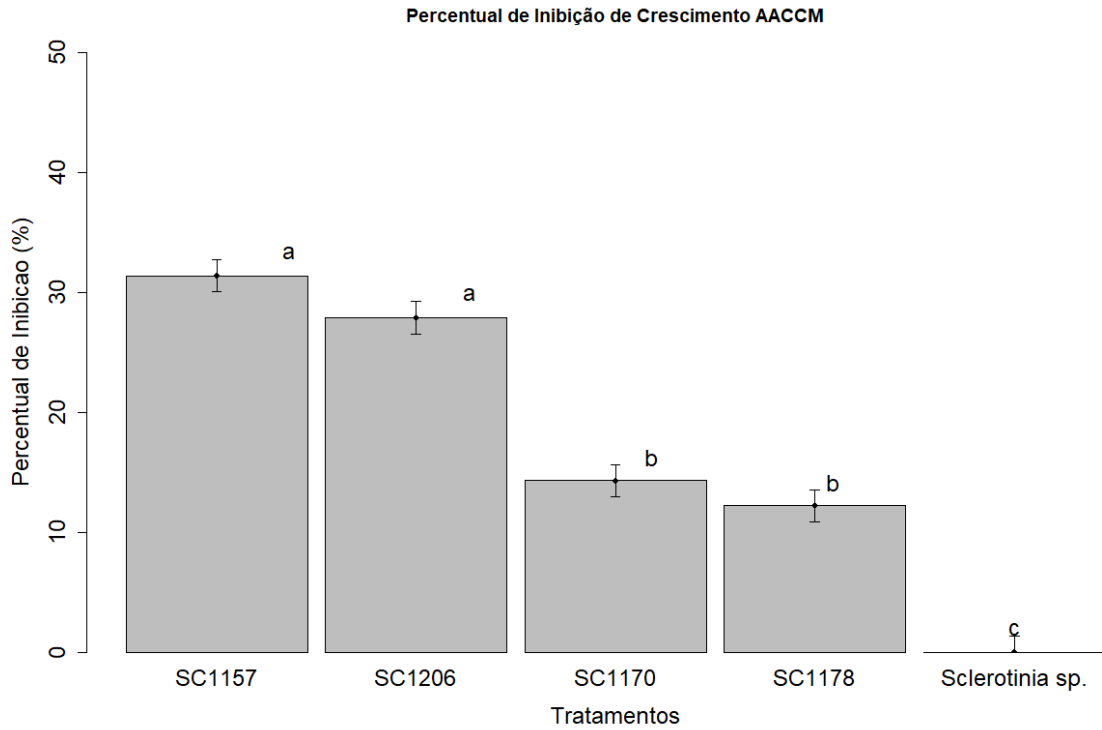
O potencial dos fungos biocontroladores do tipo antibiose para controle de *S. sclerotiorum* (Figura 8). Foi possível verificar que houve diferença em relação aos percentuais de inibição de cada fungo biocontrolador, sendo que os fungos SC1157 e SC1206 controlaram 31,4% e 27,9%, respectivamente, o crescimento micelial do patógeno e os fungos SC1170 e SC1178 foram responsáveis por 14,3% e 12,2%, respectivamente (Figura 9).

Figura 8 - Técnica de cultura pareada em avaliação do crescimento micelial de *Sclerotinia sclerotiorum* pareado com os fungos SCC1157, SC1206, SC1170 e SC1178 classificados como biocontroladores do tipo antibiose.



Fonte: Autor, 2021.

Figura 9 - Percentual de inibição da Área Abaixo da Curva do Crescimento Micelial (AACCM) de *Sclerotinia sclerotiorum*, pareado com os fungos SCC1157, SC1206, SC1170 e SC1178, classificados como biocontroladores do tipo antibiose.

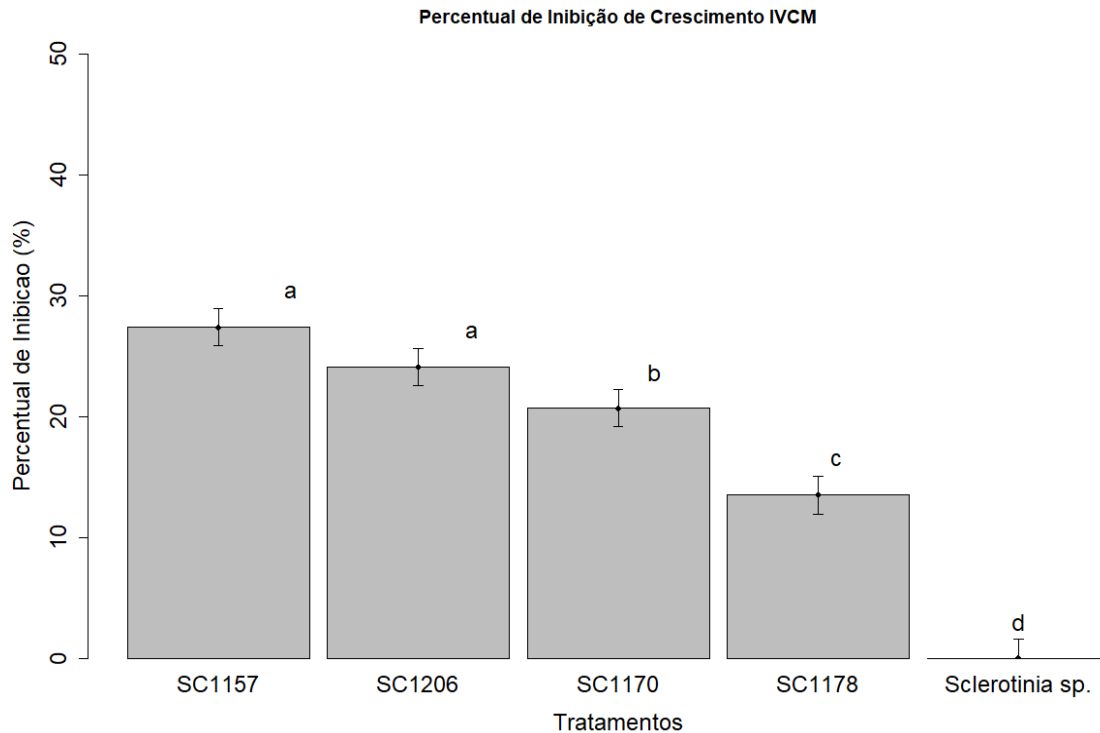


Fonte: Autor, 2021.

Legenda: Barras com letras diferentes indicam a existência de diferenças estatísticas pelo teste de Scott-Knott a 5% enquanto letras iguais indicam a ausência de diferenças significativas.

Quando analisado o IVC, os dados desse percentual não foram diferentes em relação à AACCM, no entanto o fungo SC1178, foi inferior em relação aos demais fungos. O percentual de inibição desse fungo foi de 13,5%, sendo que os demais tiveram o percentual entre 20% e 27% de inibição (Figura 10).

Figura 10 - Percentual de inibição da velocidade do crescimento micelial (%) de *Sclerotinia sclerotiorum* pareado com os fungos SCC1157, SC1206, SC1170 e SC1178 classificados como biocontroladores do tipo antibiose.



Fonte: Autor, 2021.

Legenda: Barras com letras diferentes indicam a existência de diferenças estatísticas pelo teste de Scott-Knott a 5% enquanto letras iguais indicam a ausência de diferenças significativas.

Li *et al.* (2003) realizaram o controle de *S. sclerotiorum* com o fungo *Ulocladium atrum*, no entanto, a técnica utilizada foi a observação de halo que o biocontrolador formaria, e como resultado observaram uma zona de dois mm de inibição no crescimento do patógeno.

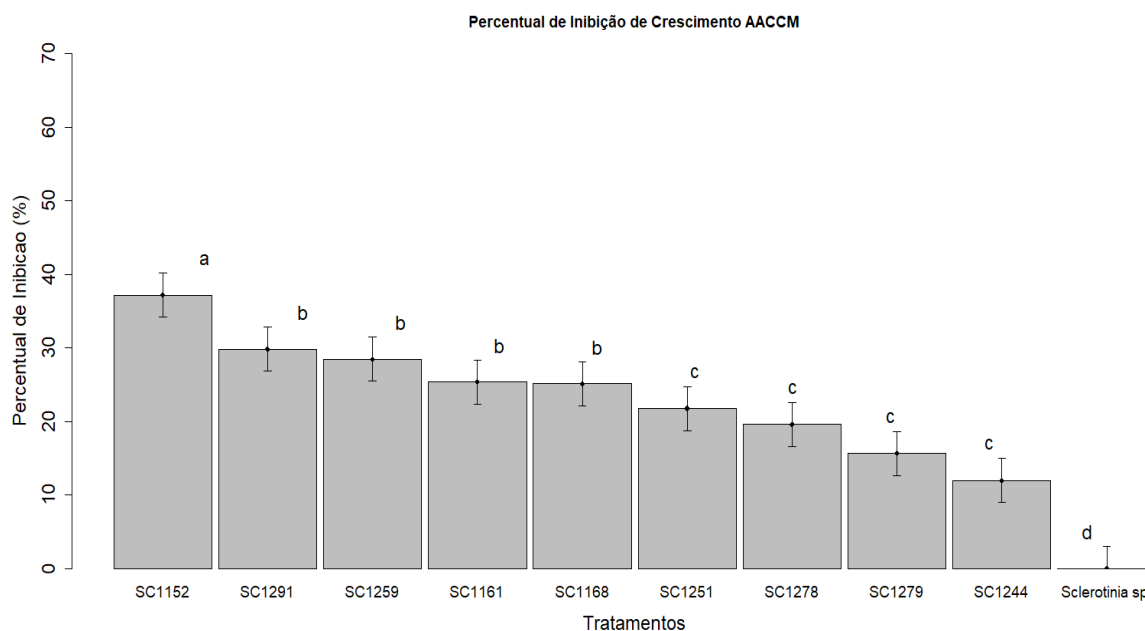
Em relação a eficiência *in vitro* dos fungos classificados como biocontrole do tipo competidor (Figura 11), obteve-se três grupos para esses fungos, pelo teste Scott-Knott a 5%. O fungo SC1152, ficou em classe superior aos demais, com média de 37,15% de inibição do crescimento micelial de *S. sclerotiorum*, o outro grupo de controladores tiveram eficiência entre 25,11% e 29,84% de inibição do patógeno, sendo também resultados satisfatórios. O terceiro grupo de biocontroladores apresentaram inibição do crescimento micelial variando de 11,98% e 21,76% (Figura 12).

Figura 11- Cultura pareada na avaliação do crescimento micelial de *Sclerotinia sclerotiorum* com os fungos SC1279, SC1259, SC1161, SC1152, SC1244, SC1168, SC1251, SC 1278 e sc1291 classificados como biocontroladores do tipo competidores.



Fonte: Autor, 2021.

Figura 12 - Percentual de inibição da Área Abaixo da Curva de Crescimento Micelial (AACCM) de *Sclerotinia sclerotiorum* pareado com nove fungos classificados como biocontroladores do tipo competição



Fonte: Autor, 2021.

Legenda: Barras com letras diferentes indicam a existência de diferenças estatísticas pelo teste de Scott-Knott a 5% enquanto letras iguais indicam a ausência de diferenças significativas.

O percentual de inibição da velocidade do crescimento micelial, foi configurado em três grupos de controladores. O percentual de inibição chegou a 57,05% para o biocontrolador SC1152, sendo assim muito satisfatório para o controle do patógeno. Outro fungo biocontrolador do mesmo grupo estatisticamente foi o SC1291, apresentando 46,56% (Figura 13) de inibição na velocidade do crescimento do patógeno. Esses dois fungos biocontroladores apresentaram os maiores percentuais nas duas avaliações *in vitro*, para controle de *S. sclerotiorum*.

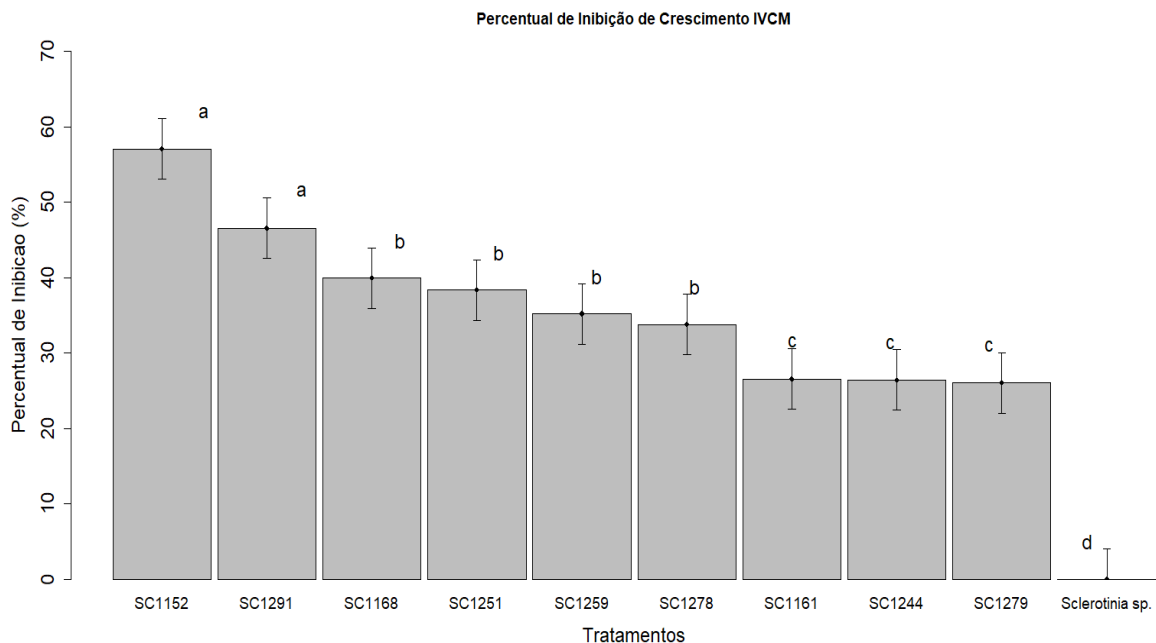
Um estudo que corrobora com o presente resultado foi apresentado por Zhang *et al.* (2015), onde avaliaram a eficiência de cepa de *T. harzianum* no controle do mofo branco, ambos coletados e isolados em solo na China. Os autores observaram uma inibição de 56,3% do crescimento micelial do patógeno, além de uma redução na produção de escleródios do fungo percentual muito próximo do encontrado neste estudo. Os autores afirmam ainda que esse controle efetivo do patógeno, ocorreu pelo micoparasitismo, onde as hifas do fungo biocontrolador crescem em paralelo ou entrelaçada com as hifas do patógeno.

Outros fungos biocontroladores mostraram-se eficientes e corroborativos com resultados no controle de *S. sclerotiorum*, como o trabalho de Zhao *et al.* (2020), onde realizaram o sequenciamento do genoma de *Coniothyrium minitans* e observaram grande

quantidade de genes que codificam enzimas de degradação da parede celular de fungos, explicando a importância da espécie e sua eficiência no controle de *S. sclerotiorum*.

O segundo grupo, é composto por outros quatro fungos biocontroladores e o percentual variou entre 33,79% e 39,92%. Já o terceiro grupo, com três fungos, houve pouca variação entre eles, pois o percentual ficou entre 26,02% e 26,56% (Figura 10). Estudos com biocontroladores de *S. sclerotiorum* vem sendo estudados por Sumida *et al.* (2018) com a utilização de diferentes cepas de *T.asperelloides* e ainda estudos como o de Matroudi *et al.* (2009), onde avaliaram a inibição do crescimento de *S. sclerotiorum* com os biocontroladores *T. harzianum*, *T. atroviride* e *T. longibrachiatum* onde obtiveram uma redução de crescimento do patógeno de até 93% com *T. atroviride*.

Figura 13 - Percentual de inibição do Índice de Velocidade do Crescimento Micelial (IVCM) de *Sclerotinia sclerotiorum* pareado com nove fungos classificados como biocontroladores do tipo competição.



Fonte: Autor, 2021.

Legenda: Barras com letras diferentes indicam a existência de diferenças estatísticas pelo teste de Scott-Knott a 5% enquanto letras iguais indicam a ausência de diferenças significativas.

Whang *et al.* (2021) afirmaram em seus estudos que as cepas de fungos biocontroladores, isoladas dos locais e na rizosfera das culturas em que se deseja aplicar, apresentam resultados ainda melhores na questão de atividades como biocontrole e biofertilizantes, uma vez que estão adaptadas ao local, como foi o caso do seu estudo com cepas nativas de *Trichoderma* isoladas de *Chelidonium majus*. O fungo apresentou atividades

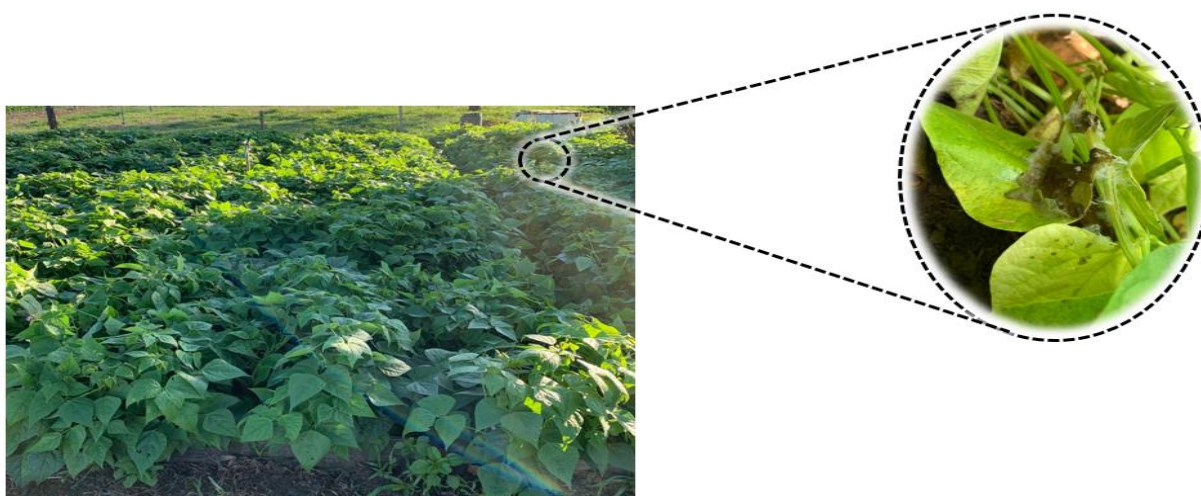
antagônicas significativas contra cinco fitopatógenos fúngicos do solo, *Fusarium oxysporum*, *S. sclerotiorum*, *Alternaria alternata*, *Cytospora chrysosperma* e *Rhizoctonia solani*.

4.4 EFICÁCIA DOS FUNGOS BIOCOTROLADORES NA CULTURA DO FEIJOEIRO EM CONDIÇÕES DE CAMPO

O feijoeiro apresentou atrasos em seu desenvolvimento, pois no período da semeadura e emergência da cultura, houve uma estiagem na região, além de temperaturas muito elevadas. Assim, o estabelecimento do estande da cultura foi apenas aos 16 dias após a semeadura (DAS). Com isso, todo o desenvolvimento acabou sendo prejudicado e o início do florescimento ocorreu aos 53 DAS, quando o ideal para a cultura deveria ter sido aos 44 DAS.

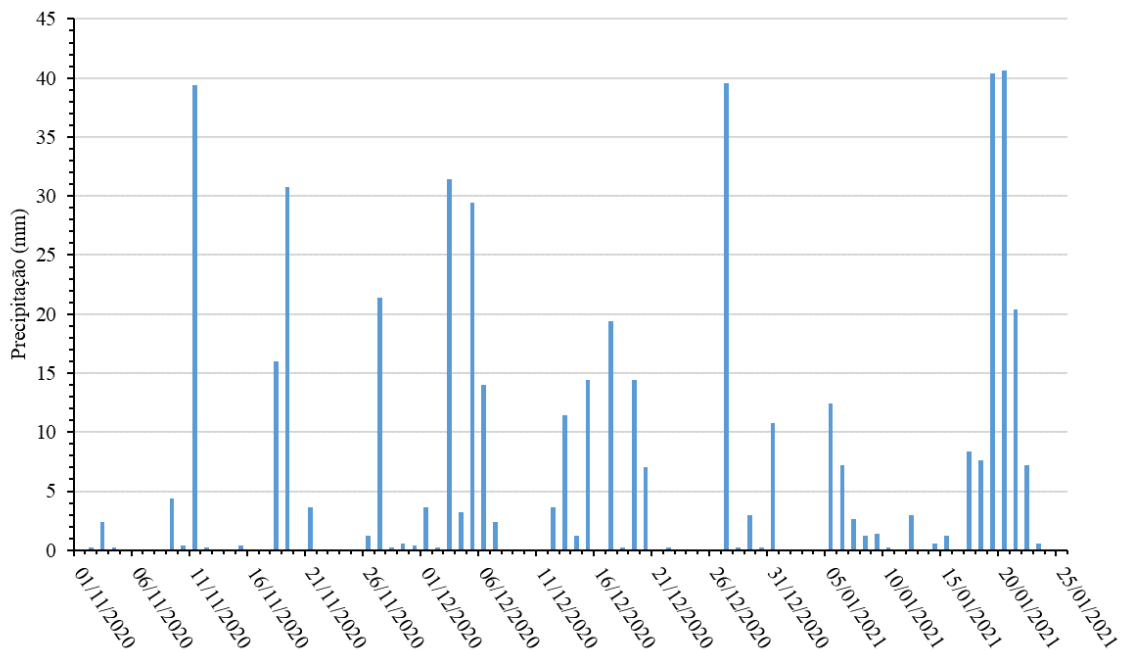
Os primeiros sinais da doença mofo branco foram observados aos 63 DAS (Figura 14), período também em que houve um aumento na frequência de chuvas na região (Figura 15). Ocorreu também nesse período uma queda de temperatura durante as noites (Figura 16), o que foi essencial para que ocorresse a doença, mas sem a formação de apotécios. A forma de infecção nas plantas ocorreu pela germinação micelial dos escleródios, portanto, as áreas onde houve um acamamento da cultura, foram as mais afetadas pela doença. Já nas áreas onde as plantas permaneceram mais eretas a doença não foi tão agressiva.

Figura 14 - Primeiros sinais em plantas de feijão infectadas com *Sclerotinia sclerotiorum*, observados aos 63 dias após a semeadura (DAS), ramos e folhas recobertas com mofo.



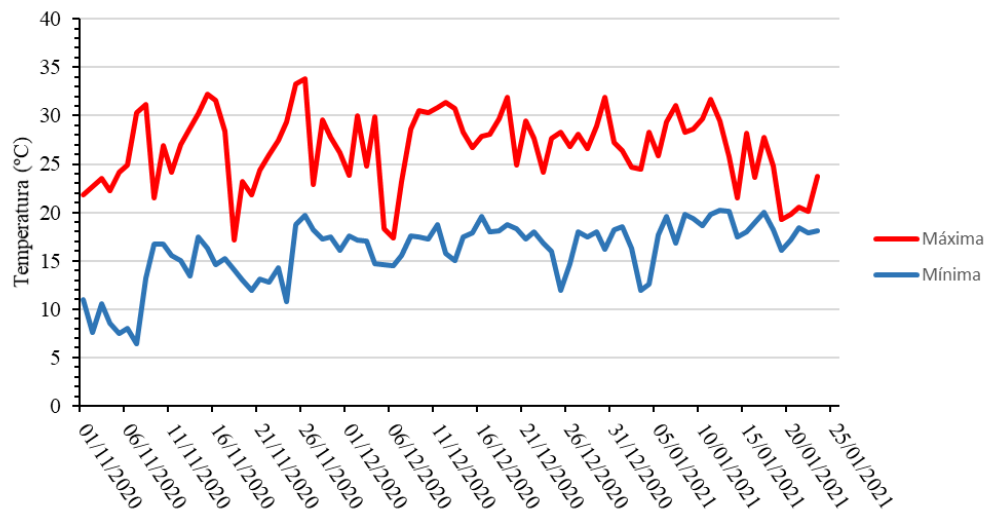
Fonte: Autor, 2021.

Figura 15 - Volume (mm) da precipitação durante a execução do experimento (período de 01/11/2020 a 23/01/2021), na fase reprodutiva da cultura.



Fonte: Dados EPAGRI Ciram; Elaborado: Autor, 2021.

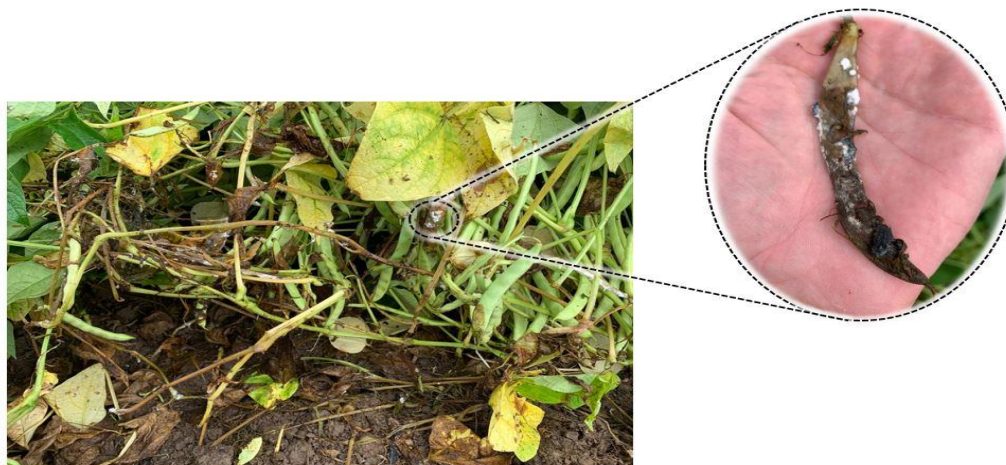
Figura 16 - Temperatura do ar máxima e mínima durante a execução do experimento período de 01/11/2020 a 23/01/2021) na fase reprodutiva da cultura.



Fonte: Dados EPAGRI Ciram; Elaborado: Autor, 2021.

Na segunda avaliação, aos 75 DAS, pode-se observar um agravamento da doença no feijoeiro. Nesse período, todos os tratamentos apresentaram algum sinal da doença, como caule e folhas recoberto com mofo e a formação de escleródios. Além disso, na testemunha, as vagens formadas que estavam mais próximas solo, foram totalmente consumidas pela *S. sclerotiorum*, com a formação de escleródios (Figura 17).

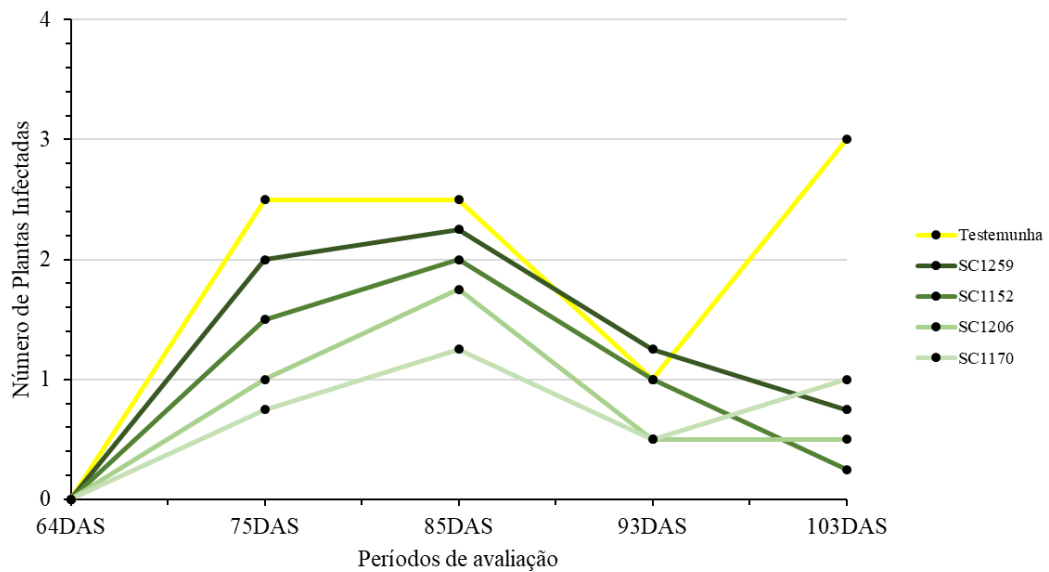
Figura 17- Plantas de feijão infectadas com *Sclerotinia sclerotiorum*, aos 75 dias após a semeadura (DAS), ramos e vagens recobertas com mofo e formação de escleródios.



Fonte: Autor, 2021.

Os fungos SC1152, SC1259 (competidores), SC1170 e SC1206 (antibiose), apresentaram bons resultados nos testes *in vitro*, tanto na produção de conídios, quanto no controle em cultura pareada. O comportamento no campo, na cultura do feijoeiro, também apresentou bons resultados em relação à média do número de plantas infectadas. Na Figura 18, pode se observar a média das plantas infectadas por período de avaliação e observar que aos 93 DAS, houve um declínio, pois, as plantas estavam em fase de maturação e apresentaram queda das folhas desfavorecendo o desenvolvimento do patógeno. No entanto, aos 103 DAS, houve um aumento do número de plantas infectadas, exceto, para os tratamentos com SC1259 e SC1152 que mantiveram o declínio da doença.

Figura 18- Número de plantas de feijão infectadas com *Sclerotinia sclerotiorum*, em diferentes períodos de avaliação em dias após a semeadura (DAS), tratadas com diferentes fungos biocontroladores da doença.



Fonte: Autor, 2021.

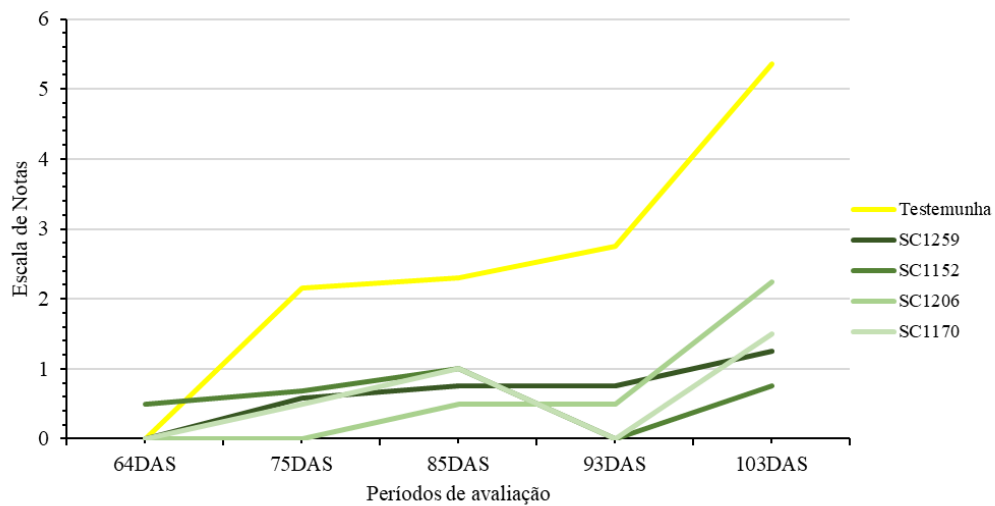
Estudos avaliando a eficácia de agentes biocontroladores vem sendo realizados, como o de Chitrampalam *et al.* (2008), que avaliaram diferentes biocontroladores sobre a cultura do alface infectada com mofo branco. Os produtos testados foram todos de formulação comercial baseada em *T. harzianum*, *Gliocladium virens*, *Coniothyrium minitans* e *Bacillus subtilis* além do fungicida Rovral, e em resumo o único produto que foi eficaz no controle do mofo branco foi o produto a base de *Coniothyrium minitans*, os demais produtos não apresentaram eficácia no controle do fungo a campo.

Há um maior número de estudos em relação às espécies de *Trichoderma* ao desenvolvimento de produtos mais persistentes no campo para aplicação via tratamento de sementes ou diretamente no solo, porém há uma carência de estudos comparando a eficácia e persistência entre microescleródios e conídios aéreos em condições de campo.

Com relação a severidade da doença (Figura 19), os biocontroladores conseguiram reduzir, em relação a testemunha, o desenvolvimento do mofo branco. O fungo MCCR/SC1152, apareceu como o mais eficiente, uma vez que aos 75 DAS, a média da severidade para esse tratamento estava crescente, já aos 85 DAS, a média caiu e continuou a diminuir até final do ciclo. Além disso, as plantas que continham mofo branco não apresentaram mais sinais do patógeno aos 93 DAS. Aos 103 DAS, todos os tratamentos tiveram um aumento da severidade da doença, por ocasião das chuvas e a queda da

temperatura, no entanto, todos os tratamentos, apresentaram uma severidade menor quando comparado com a testemunha.

Figura 19 – Escala de notas para a severidade do mofo branco (*Sclerotinia sclerotiorum*) na cultura do feijoeiro, tratados com diferentes fungos biocontroladores, a partir do aparecimento dos sinais do patógeno



Fonte: Autor, 2021.

Aos 97 DAS foi analisado a área para a realização da colheita, que seria o ideal para que a planta completasse seu ciclo, mas pela decorrência da seca no início da safra e pela planta apresentar um perfil de crescimento indeterminado, as vagens da parte superior da planta ainda apresentavam o grão verde (Figura 20).

Figura 20 - Perfil das vagens e grãos do feijão aos 97 dias após a semeadura.



Fonte: Autor, 2021.

A colheita do feijoeiro foi realizado de forma manual aos 103 DAS, período que coincidiu com grande quantidade de chuvas, sem a ocorrência de aberturas de sol, o que resultou no brotamento dos grão ainda na vagem (Figura 21). Por esse motivo, não foi possível realizar o peso dos grãos e a produtividade do feijão, uma vez que toda a safra foi perdida.

Figura 21 - Vagens com grãos brotados no momento da colheita do feijão aos 103 dias após a semeadura.



Fonte: Autor, 2021.

Na Tabela 3, constam os dados de altura das plantas, comprimento das raízes e número médio de vagens por planta. Com relação a altura das plantas, não foi possível observar diferença estatística entre os tratamentos. Já em relação ao comprimento das raízes das plantas de feijoeiro tratadas com os fungos biocontroladores, foram estatisticamente maiores em relação a testemunha. O tratamento com o SC1206 alcançou uma média de 24,9 cm, quando a média da testemunha, sem aplicação de biocontroladores ficou em 17,2 cm.

Tabela 3 - Efeito da aplicação de fungos biocontroladores na altura das plantas (m), comprimento das raízes (cm) e no número de vagens do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) em condições de campo aos 103 dias após a semeadura.

Tratamento	Altura (m)	Comprimento raízes (cm)	Nº vagens por plantas
Testemunha	0,85 a	17,2 b	7,7 b
SC1170	1,13 a	22,9 a	14,8 a
SC1206	1,18 a	24,9 a	19,3 a
SC1259	0,99 a	21,4 a	16,3 a
SC1152	1,09 a	24,3 a	19,1 a
CV (%)	18,0	16,1	21,5

Médias com letras iguais não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($p < 5\%$).

Broetto (2013) observou o incremento significativo na altura de plantas de feijão, quando inoculado com diferentes isolados fúngicos, sendo observado um aumento de 64% em relação a testemunha, resultado diferente do encontrado nesse estudo, que pode estar relacionado a fatores como fertilidade do solo, condições climáticas, ou ainda ao potencial do isolado. Santos *et al.* (2020), observaram um incremento na biomassa de parte aérea e raiz do feijão quando realizado duas aplicação de isolados de *Trichoderma*, resultados ainda que parcialmente, contribuem para os encontrados nesse estudo, na qual as plantas que foram tratadas com os fungos tiveram um aumento no comprimento das raízes.

Além do mais, outros trabalhos também verificaram o incremento de crescimento e biomassa da planta quando aplicado fungos com potencial de biocontrole, como Resende *et al.* (2004) na cultura do milho, Chagas *et al.* (2017) na cultura de milho, arroz, soja e feijão, observação de incremento de até 60%.

O componente de produtividade foi avaliado pelo número de vagens das plantas (Tabela 3), onde todos os tratamentos diferiram da testemunha. O tratamento com o biocontrolador SC1206, apresentou média de 19,3 vagens por planta, enquanto a testemunha teve uma média de 7,7 vagens. Esse resultado pode ter ocorrido pela menor severidade da doença nas plantas tratadas. Podemos ressaltar que os tratamentos que tiveram maior número de vagens, também foram os melhores em relação ao comprimento das raízes das plantas.

O número de vagens encontrado nesse estudo foi maior do que verificado pelo estudo de Carvalho *et al.* (2015), onde observaram uma média de 8,4 a 12,2 vagens por planta. Além disso, os autores não encontraram diferenças significativas em relação aos tratamentos onde aplicaram isolados de *Trichoderma*. Já no presente estudo, ainda que não sejam espécies de biocontroladores conhecidas, houve diferença significativa com a testemunha, notando-se um incremento na produtividade (número de vagens).

Ali e Atallah (2020), realizaram a aplicação de isolados de *Trichoderma* sp. para o controle de mofo branco em feijão e observaram a redução agressividade da doença no componente de produtividade, assim como em nosso estudo, que podemos correlacionar, que a testemunha teve maior número de plantas infectadas e conseqüentemente menor número de vagens por planta.

5 CONCLUSÃO

A partir dos resultados encontrados, foi possível verificar que o método de Castellani é seguro e eficiente para o armazenamento de fungos, pois, além da conservação das características morfológicas, os fungos se mantiveram eficientes no controle do patógeno após o período de armazenamento.

Em relação aos substratos avaliados para estimular a produção de conídios dos fungos biocontroladores, todos foram eficientes, contudo, o arroz parboilizado foi o qual todos os fungos produziram conídios, sendo o isolado SC1152 que teve maior produção e em meio líquido o tratamento três se destacou para o isolado SC1161.

Com os testes *in vitro* no biocontrole de *S. sclerotiorum*, foram observados diferentes grupos em relação ao potencial de controle, tanto para o controle do tipo antibiose, quanto para o tipo de controle dos competidores, obtivemos três grupos, mas todos os fungos testados foram eficientes no controle do patógeno.

O desenvolvimento desse estudo confirma, ainda, que os isolados foram efetivos no controle da doença na cultura do feijoeiro em condições de campo, o que justifica a necessidade de continuidade nos estudos para a tecnologia de aplicação desses biocontroladores e além da identificação desses isolados que apresentaram eficiência no controle da *S. sclerotiorum*.

REFERÊNCIAS

- AGRANDA. **Agranda Sementes**. Disponível em: <https://www.agranda.com.br/>. Acesso em: 10 out. 2020.
- AGRIOS, G.N. **Plant pathology**. 2.ed. San Diego: Academic Press, 2005. 635p.
- AGROFIT. **Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários**. Disponível em: http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 20 de Janeiro 2021.
- ALI, M.; ATALLAH, O. O. Controlling common bean white mould caused by *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary. **Zagazig Journal of Agricultural Research**, v. 47, n. 1, p. 101-117, 2020.
- AMORIM, L. *et al.* **Manual de Fitopatologia**. Volume 2-Doenças de plantas cultivadas. 5. ed. Ouro Fino - Mg: Agronômica Ceres, 2016. 810 p.
- AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. **Manual De Fitopatologia**-Volume I - Princípios e conceitos. 5 ed, Ouro Fino: Universidade de São Paulo, 2018. 573 p.
- APARECIDO, C.; CAMILO, C. Comparação de métodos para a preservação de fungos do gênero *Colletotrichum* em laboratório. **Biológico, São Paulo**, v. 75, n. 1, p. 17-22, 2013.
- ÁVILA, Z.R. *et al.* Seleção de isolados de *Trichoderma* spp. antagônicos a *Sclerotium rolfsii* e *Sclerotinia sclerotiorum*. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2005. 30p. (Boletim de pesquisa e desenvolvimento, 117).
- BARBOSA, F. R.; GONZAGA, A.C.O. **Informações técnicas para o cultivo do feijoeiro-comum na região central brasileira: 2012-2014**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2012. 247p. (Embrapa Arroz e Feijão. Documentos, 272).
- BELL, D. K.; WELLS, H. D.; MARKHAM, C. R. *In vitro* antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. **Phytopathology**, v. 72, n. 4, p. 379-382, 1982.
- BOLAND, G. J.; HALL, R. Index of plants of hostes *Sclerotinia sclerotiorum*. **Canadian Journal Plant Pathology**, Ottawa, v. 16, n.1, pg. 93 – 108. 1994.
- BOLTON, M. D.; THOMMA, B.P.H.J.; NELSON, B.D.; *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary: Biology and molecular traits of cosmopolitan pathology. **Mol Plant Pathol**. p.7:1, n.16. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2005.00316.x>
- BUÉE, M. *et al.* Soil niche effect on species diversity and catabolic activities in an ectomycorrhizal fungal community. **Fems Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 39, n. 8, p. 1947-1955, 2007.
- BROETTO, L. Antagonismo a *Macrophomina phaseolina* e promoção do crescimento em feijoeiro mediados por *Trichoderma* spp. 2013.

CAMPBELL, C.L.; MADDEN, Laurence V. **Introduction to plant disease epidemiology**. New York: Ed. J. Wiley, 1990.

CAMPANHOLA, C., BETTIOL, W. 2003. **Métodos alternativos de controle fitossanitário**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica. 279p.

CAPRILES, C. H.; MATA, S.; MIDDELVEEN, M. Preservation of fungi in water (Castellani): 20 years. **Mycopathologia**, v. 106, n. 2, p. 73-79, 1989.

CARVALHO, D. D. C. *et al.* Biological control of white mold by *Trichoderma harzianum* in common bean under field conditions. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 50, n. 12, p. 1220-1224, dez. 2015. <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-204x2015001200012>.

CASTELLANI, A. Further researches on the long viability and growth of many pathogenic fungi and some bacteria in sterile distilled water. **Mycopathologia et mycologia applicata**, v. 20, n. 1-2, p. 1-6, 1963.

CAVALCANTE, R. S. *et al.* Effect of moisture on *Trichoderma* conidia production on corn and wheat bran by solid state fermentation. **Food and Bioprocess Technology**, v. 1, n. 1, p.100-104, 21 nov. 2007. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11947-007-0034-x>.

CHAGAS, L. F. B. *et al.* *Trichoderma* na promoção do crescimento vegetal. **Revista de Agricultura Neotropical**, Cassilândia-MS, v. 4, n. 3, p. 97-102, set. 2017.

CHEN, X. *et al.* Application of response surface methodology in medium optimization for spore production of *Coniothyrium minitans* in solid-state fermentation. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 21, n. 4, p. 593-599, jun. 2005. <http://dx.doi.org/10.1007/s11274-004-3492-6>.

CHITRAMPALAM, P. *et al.* Biocontrol of lettuce drop caused by *Sclerotinia sclerotiorum* and *S. minor* in desert agroecosystems. **Plant Dis.** v. 92, p. 1625-1634, 2008.

CONAB, Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento safra brasileira grãos**, v. 7 - Safra 2019/20 - Nono levantamento, Brasília, p. 1-66, junho 2020.

DROBY, S. *et al.* The science, development, and commercialization of postharvest biocontrol products. **Postharvest Biology and Technology**, v. 122, p.22-29, dez. 2016. doi.org/10.1016/j.postharvbio.2016.04.006.

EMBRAPA, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Solos do Estado de Santa Catarina**. - Rio de Janeiro. Embrapa Solos, Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento; n. 46. 2004.

ESSIEN, J.P.; AKPAN, E.J.; ESSIEN, E.P. Studies on mould growth and biomass production using waste banana peel. **Bioresource Technology**, Nigeria, v. 1, n. 1, p. 1451-1456, 05 fev. 2005.

FAHMI, A.I., TAHHI, A. L., HASSAN, M.M. Protoplast fusion enhances antagonistic activity in *Trichoderma* sp. **Nat Science**, v.10, n.5, p.100-106, 2012.

FIGUEIREDO, M.B. Estudo sobre a aplicação do método de Castellani para conservação de fungos patógenos em plantas. **Biológico**, São Paulo, v.33, p.9-13, 1967.

FINATTI; D; APARECIDO, C.C. Caracterização fisiológica e comparação de diferentes métodos na preservação, em laboratório, de isolados do gênero *Verticillium*. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v.76, n.4, p.715-720, dez., 2009.

FORTES, F. O. *et al.* Promoção de enraizamento de microestacas de um clone de *Eucalyptus* sp. por *Trichoderma* spp. **Revista Árvore**, v. 31, n. 2, p. 221-228, 2007.

GÖRGEN *et al.* C. A. Controle do mofo-branco com palhada e *Trichoderma harzianum* 1306 em soja. **Pesq. Agropec. Bras., Brasília**, v.44, n.12, p.1583-1590, dez. 2009

GOI, S. R.; SOUZA, F. A. Diversidade de microrganismos do solo. **Floresta e Ambiente**, Seropédica, v. 13, n. 2, p. 46-65, 2006.

GRAHAM, P.H.; RANALLI, P. Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Field Crops Research**, Bologna, p. 131-146, 06 jun. 1997.

HARMAN, G.E. *et al.* Production of conidial biomass of *Trichoderma harzianum* for biological control. **Biological Control**, v. 1, n. 1, p.23-28, jun. 1991. [http://dx.doi.org/10.1016/1049-9644\(91\)90097-j](http://dx.doi.org/10.1016/1049-9644(91)90097-j).

HEWAVITHARANA, N.; KANNANGARA, S. D. P.; SENANAYAKE, S. P. Isolation, identification and mass production of five *Trichoderma* spp. on solid and liquid carrier media for commercialization. **International Journal of Applied Science and Biotechnology**, v. 6, n. 4, p. 285- 293, 2018

HIRATA, C. A.; ANDRADE FILHO, G. Abordagem teórica das interações ambientais entre nutrição de plantas e microrganismos. **Geografia (Londrina)**, Londrina, v. 20, n. 3, p. 191-216, dez. 2011. URL: <http://www.uel.br/revistas/uel/index.php/geografia>

HEFFER LINK, V., JOHNSON, K. B. White Mold. The Plant Health Instructor, p.1-1, 2012. **Scientific Societies**. <http://dx.doi.org/10.1094/phi-i-2007-0809-01>.

HUANG, H.C *et al.* Foliar application of fungal biocontrol agents for the control of white mold of dry bean caused by *Sclerotinia sclerotiorum*. **Biological Control**, v. 18, n. 3, p. 270-276, jul. 2000. <http://dx.doi.org/10.1006/bcon.2000.0829>.

HYDER, S. *et al.* Novel potential of *Trichoderma* spp. as biocontrol agent. **Journal of Entomology and Zoology Studies**, Pakistan, v. 4, n. 5, p.214-222, jun. 2017.

JACKSON, M. A.; MASCARIN, G. M.; KOBORI, N. N. *Trichoderma* microsclerotia and methods of making. US Patent 9642372, 2015. 16 p.

JENKINS, N.E. *et al.* Development of mass production technology for aerial conidia for use as mycopesticides. **Biocontrol News and Information**, v.31, n.2, p.21-31, 1998.

- JIN, X. *et al.* Development of media and automated liquid fermentation methods to produce desiccation-tolerant propagules of *Trichoderma harzianum*. **Biological Control**, v. 7, n. 3, p. 267-274, dez. 1996. <http://dx.doi.org/10.1006/bcon.1996.0093>.
- KHANG V. T. *et al.* Isolation and selection of *Trichoderma* spp. Exhibiting high antifungal activities against major pathogens in Mekong Delta. **Omonrice**. n. 19, p.159-171, 2013.
- KOBORI, N. N. *et al.* Liquid culture production of microsclerotia and submerged conidia by *Trichoderma harzianum* active against damping-off disease caused by *Rhizoctonia solani*. **Fungal Biology**, v. 119, n. 4, p. 179-190, 2015
- KOIKE, C. M.; LUCON, C. M. M. Efeito de diferentes fatores na esporulação e crescimento de isolados de *Trichoderma* spp. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v.70, suplemento 3, p.96-99, 2003
- KOMALA, G.; MADHAVI, G. B.; NATH, R. Shelf life studies of different formulations of *Trichoderma harzianum*. **Plant cell biotechnology and molecular biology**, p. 1100-1105, 2019.
- LANDAU, E. C.; MOURA, L. Evolução da produção de feijão (*Phaseolus vulgaris*, Fabaceae). **Embrapa Milho e Sorgo-Capítulo em livro científico (ALICE)**, 2020.
- LARENA, I.; CAL, A. de; MELGAREJO, P. Solid substrate production of *Epicoccum nigrum* conidia for biological control of brown rot on stone fruits. **International Journal of Food Microbiology**, Madrid, v. 1, n. 1, p. 161-167, 16 jun. 2003.
- LEITE, L.G. *et al.* (Ed.). **Produção de fungos entomopatogênicos**. Ribeirão Preto: A.S. Pinto, 2003. 92p.
- LI, G.Q.; HUANG., H.C.; ACHARYA, S.N. Antagonism and biocontrol potential of *Ulocladium atrum* on *Sclerotinia sclerotiorum*. **Biological Control**, Canada, v. 1, n. 1, p. 11-18, 19 fev. 2003.
- LIMA, U.A. *et al.* **Biotecnologia industrial processos fermentativos e enzimáticos**. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. v.3, 593p.
- LONSANE, B.K. *et al.* Engineering aspects of solid-state fermentation. **Enzyme and Microbial Technology**, v.7, n.6, p.258-265, 1985.
- MARQUES, E. *et al.* New isolates of *Trichoderma* antagonistic to *Sclerotinia sclerotiorum*. **SciELO**, Campinas, v. 16, n. 3, p.1-5, 10 set. 2016.
- MATROUDI, S.; ZAMANI M. R.; MOTALLEBI M. Antagonistic effects of three species of *Trichoderma* sp. On *Sclerotinia sclerotiorum*, the causal agent of canola stem rot. **Egyptian Journal of Biology**, v. 11, n. 1, p. 37-44, nov. 2009.
- MEDRADO, P. H. da S. **Prospecção de fungos do solo para o controle biológico de fitopatógenos**. 2019. 86 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-graduação em Ecossistemas Agrícolas e Naturais, Universidade Federal de Santa Catarina, Curitibanos, 2019.

- MELO, I. S. de; VALARINI, P. J. Potential of rhizobacteria in the control of *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. In cucumber (*Cucumis sativum* L.). **Scientia Agricola**, v. 52, n.2, p. 326-330, 1995.
- MENTEN, J. O. M. *et al.* Efeito de alguns fungicidas no crescimento micelial de *Macrophomina phaseolina* (Tass.) Goid. “in vitro”. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 1, n. 2, p. 57-66, 1976.
- MEYER, M. C; MAZARO, S. M.; SILVA, J. C da. **Trichoderma USO NA AGRICULTURA**. Brasília, DF: Embrapa, 2019. 538 p.
- MONTEIRO, M. C. P. **Identificação de fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* em solos preservados do cerrado**. 2012. 77 f. Dissertação (mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.
- MONTOYA GONZALEZ, A.H., QUIJANO VICENTE, G. Isolation of *Trichoderma* spp. from desert soil, biocontrol potential evaluation and liquid culture production of conidia using agricultural fertilizers. **Journal of Fertilizers ; Pesticides**, v. 7, n. 1, p.01-06, 2016. <http://dx.doi.org/10.4172/2471-2728.1000163>.
- MORANDI, M.A.B. *et al.* Selection of *Trichoderma* spp. isolates to control the bean white-mold fungus *Sclerotinia sclerotiorum* in winter crops. Spa, Belgium. **Proceedings. IOBC/WPRS Bulletin**, v. 30, n. 6, p. 79-82, 2007.
- MUELLER, D. S. *et al.* Efficacy of fungicides on *Sclerotinia sclerotiorum* and their potential for control of *Sclerotinia* stem rot on soybean. **Plant Dis.**86:26-31. 2002.
- MUNIZ, P. H. P. C. *et al.* Produção de conídios em substrato sólido e colonização superficial por *Trichoderma harzianum*. **Revista de Agricultura Neotropical**, Cassilândia-MS, v. 5, n. 4, p. 40-44, dez. 2018.
- NAPOLEÃO, R. *et al.* Intensidade do mofo-branco do feijoeiro em plantio convencional e direto sob diferentes lâminas d’água. **Fitopatologia Brasileira**. v. 30, p. 374-379. 2005.
- OLIVEIRA, J. A. Efeito do tratamento fungicida em sementes e no controle de tombamento de plântulas de pepino (*Cucumis sativas* L.) e pimentão (*Capsicum annanum* L.). **Ciência e Prática**, v. 16, p. 42-47, 1992.
- PACHECO, K. R. **Avaliação de *Trichoderma* e de fosfito no controle de *Sclerotium rolfsii* agente da murcha-de-esclerócio em feijoeiro**. Brasília, 2012. 75 f. Dissertação (Mestrado) Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2012.
- PAN, H. *et al.* Diversity analysis of soil dematiaceous hyphomycetes from the Yellow River source area. **Journal of Zehejiang University Science B**, Hangzhou, v. 9, n. 10, p. 829-834, 2008.
- PANDEY, A. Solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v.13, n.2/3, p.81-84, 2003.

PASSADOR, M. M. *et al.* Manutenção da viabilidade e patogenicidade de culturas mantidas na micoteca “Mário Barreto Figueiredo”. **Biológico, São Paulo, [online]**, v. 72, n. 1, p. 51-55, 2010.

PATIL, A., LADDHA, A., LUNGE, A. *In vitro* antagonistic properties of selected *Trichoderma* species against Tomato root rot causing *Pythium* species. **Int. J. Sci, Environ. and Technol.** v.1 n.4, p.302-315, 2012.

DE PAULA JÚNIOR, T. J. *et al.* Comercialização de produtos biológicos para o controle de doenças de plantas e pragas no Brasil. **Embrapa Meio Ambiente-Artigo em periódico indexado (ALICE)**, 2009.

PERKINS D. D. Advantages of using the inactive-matingtype a m1 strain as a helper componente in heterokaryons. **Neurospora Newslett.** n. 31, p.41-42, 1984.

RAMÍREZ-VALDESPINO, C. A.; CASAS-FLORES, S.; OLMEDO-MONFIL, V. *Trichoderma* as a model to study effector-like molecules. **Frontiers in microbiology**, v. 10, p. 10-30, 2019.

REIS, V. M. *et al.* Interações de fungos micorrízicos arbusculares com outros mecanismos do solo. **Micorrizas**, v. 30, 2010.

RESENDE, M. L. *et al.* Inoculação de sementes de milho utilizando o *Trichoderma harzianum* como promotor de crescimento. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 28, n. 4, p. 793-798, 2004.

REY, M. *et al.* Improvement of *Trichoderma* strains for biocontrol. **Revista Iberoamericana de Micologia.** n. 17, p.31-36, 2000.

SANTORO, P. H. *et al.* *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. spores production in biphasic process utilizing different liquid media. Semina: **Ciências Agrárias**, Londrina, v. 26, n. 3, p. 313-320, jul. 2005

SARGIN, S. *et al.* Micropropagule production from *Trichoderma harzianum* EGE-K38 using solid-state fermentation and a comparative study for drying methods. **Turkish Journal of Biology**, v. 37, n. 2, p. 139-146, 2013.

SENE, L. *et al.* Produção de conídios de *Metarhizium anisopliae* em meio sólido à base de resíduos agroindustriais. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v.77, n.3, p.449-456, jul., 2010

SILVA, J. L. A. *et al.* Chemical and biological management of white mold (*Sclerotinia sclerotiorum*) disease in irrigated common beans (*Phaseolus vulgaris*) cultivation. **African Journal of Agricultural Research**, v. 13, n. 46, p.2631-2640, 15 nov. 2018. Academic Journals. <http://dx.doi.org/10.5897/ajar2018.13060>.

SILVA, J. B. T.; MELLO, S. C. M. Utilização de *Trichoderma* no controle de fungos fitopatogênicos. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2007.

SILVA, O. F.; WANDER, A. E. O feijão-comum no Brasil: passado, presente e futuro. **Embrapa Arroz e Feijão-Documentos (INFOTECA-E)**, 2013.

SOUSA, B. R. de. *et al.* Techniques for obtaining, maintenance and reactivating microbial cultures. **Journal of medicine and health promotion**. Paraiba, v. 2, n. 3, p. 827-847, dez. 2017.

SUMIDA, C. H. *et al.* Inibição micelial *in vitro* de *Sclerotinia sclerotiorum* por fungicidas. **Summa Phytopathologica**, v. 40, n. 1, p. 90-91, 2014.

TEWARI, L.; BHANU, C. Evaluation of agro-industrial wastes for conidia based inoculum production of bio-control agente: *Trichoderma harzianum*. **Journal of scientific; Industrial Research**, v. 1, n. 63, p. 807-812, Out. 2004.

THANGAVELU, R.; PALANISWAMI, A.; VELAZHAHAN, R. Mass production of *Trichoderma harzianum* for managing fusarium wilt of banana. **Agriculture, ecosystems; environment**, v. 103, n. 1, p. 259-263, 2004.

VERGARA, C. *et al.* Plant-mycorrhizal fungi interaction and response to inoculation with different growth-promoting fungi. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 54, p.1-24, 2019. <http://dx.doi.org/10.1590/s1678-3921.pab2019.v54.25140>.

VIEIRA, R.F. *et al.* Fungicidas aplicados via água de irrigação no controle do mofo-branco no feijoeiro e incidência do patógeno na semente. **Fitopatologia Brasileira**. v. 26, p.770-773. 2001.

WANG, Y. *et al.* A native *Trichoderma harzianum* strain Th62 displays antagonistic activities against phytopathogenic fungi and promotes the growth of *Celosia cristata*. **Horticulture, Environment, And Biotechnology**, p. 1-11, 7 jan. 2021. <http://dx.doi.org/10.1007/s13580-020-00307-w>.

WENDLAND, A. **Manual de identificação das principais doenças do feijoeiro comum**. Brasília, DF: Embrapa, 2018. 49 p.

WHEELER, T.; RUSH, C.M. Soil borne diseases. In: MALOY, O.C.; MURRAY, T.D.(Eds.). **Encyclopedia of plant pathology**. New York: John Wiley; Sons, p.935-947, 2001.

ZANCAN, W. L. A. **Sensibilidade a fungicidas e efeito de *Sclerotinia sclerotiorum* em sementes de feijoeiro**. 2011. 86 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Agronomia, Fitopatologia, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011. Cap. 1.

ZAMBOLIM, L., JESUS JUNIOR, W. C. de, RODRIGUES, F. Á. O essencial da fitopatologia: Controle de doenças de plantas. 1 ed. Viçosa, UFV, 2014, p.576.

ZHANG, F.. Biocontrol potential of *Trichoderma harzianum* isolate T-aloe against *Sclerotinia sclerotiorum* in soybean. **Plant Physiology and Biochemistry**, Xinjiang, v. 1, n. 1, p. 64-74, 8 jan. 2016.

ZHAO, S.; SHAMOUN, S. F. The effects of culture media, solid substrates, and relative humidity on growth, sporulation, and conidial discharge of *Valdensinia heterodoxa*. **Mycological Research**, Victoria, v. 1, n. 1, p. 1340-1346, 25 out. 2006.

ZHAO, H. *et al.* Mycoparasitism illuminated by genome and transcriptome sequencing of *Coniothyrium minitans*, an important biocontrol fungus of the plant pathogen *Sclerotinia sclerotiorum*. **Microbial Genomics**, v. 6, n. 3, p. 1-19, 1 mar. 2020. Microbiology Society. <http://dx.doi.org/10.1099/mgen.0.000345>.